

THESIS

WURZBURG

1967

Aus der Klinik und Poliklinik für Haut- und Geschlechtskrankheiten
der Universität Würzburg

Direktor: Professor Dr. med. H. Röckl

JANIE MEDICAL LIBRARY OF
STANFORD UNIVERSITY
300 PASTEUR ROAD
PALO ALTO, CALIFORNIA

EXPERIMENTELLE UNTERSUCHUNGEN ZUR ISOLIERUNG DES EKZEMATOGENEN
TEICHINSÄURE-GLYCOSAMINOPEPTIDS VON STAPHYLOCOCCUS AUREUS

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n

verfaßt und der

Hohen Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde

vorgelegt von

Günter Camphausen

aus Mülheim/ Ruhr

Würzburg 1967



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA40153518_0220

Aus der Klinik und Poliklinik für Haut- und Geschlechtskrankheiten
der Universität Würzburg
Direktor: Professor Dr. med. H. Röckl

EXPERIMENTELLE UNTERSUCHUNGEN ZUR ISOLIERUNG DES EKZEMATOGENEN
TEICHINSÄURE-GLYCOSAMINOPEPTIDS VON STAPHYLOCOCCUS AUREUS

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n

verfaßt und der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde

vorgelegt von
Günter Camphausen
aus Mülheim/ Ruhr

Würzburg 1967

Referent: Privatdozent Dr. med. F. Schröpl

Korreferent: Professor Dr. med. H. Röckl

Tag der Promotion:

18. 1. 68

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Universität Würzburg

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
A. PROBLEMSTELLUNG	1
B. LITERATURÜBERSICHT	3
I. Bisher bekannte Eigenschaften der ekzemauslösenden Stoffe von Staphylococcus aureus	3
II. Zellwandbestandteile von Staphylococcus aureus	5
III. Polysaccharidfraktion von Staphylococcus aureus	9
IV. Teichinsäuren	11
1. Übersicht	11
2. Funktion	13
3. Allgemeine Struktur	14
4. Bindung der Teichinsäure an die Basalstruktur (Mucopeptid)	14
5. Wandteichinsäuren einzelner Bakterienarten	16
6. Intrazelluläre Teichinsäuren	19
7. Teichinsäuren von Staphylokokken	20
8. Immunologische Eigenschaften der Staphylococcus aureus-Teichinsäure	22
C. EIGENE UNTERSUCHUNGEN	25
I. Material	25
1. Ausgangsmaterial: CKF	25
2. Versuchspersonen	25
3. Versuchstiere	25
II. Methodik	26
1. Epicutantests	26
2. Intracutantests	26
3. Histologische Untersuchungen	26
4. Ultrafiltration	26
5. Gelfiltration	27
6. Polysaccharidisolierung nach Enteiweißung mit Benzidinhydrochlorid (PS-B)	27

	Seite
7. Polysaccharidisolierung nach Ent-	28
eiweißung mit Chloroform-Butanol (PS-C)	
8. Hydrolyseversuche	28
9. Andere Methoden zur Polysaccharid- bzw.	29
Teichinsäureisolierung	
10. Papierchromatographische Untersuchungen	29
11. Elektrophoretische Untersuchungen	29
12. Färbemethoden	30
13. Immunologische Untersuchungen	30
14. Arbeitstemperatur	31
III. Ergebnisse	32
1. Wirksamkeit des CKF und seiner durch	32
Ultrafiltration gewonnenen Fraktionen	
III a und III b (Vorversuch)	
2. Auftrennung des CKF durch Gelfiltration	34
3. Polysaccharidisolierung mit Hilfe der	38
Benzidinhydrochloridmethode	
4. Polysaccharidisolierung mit Hilfe der	39
Chloroform - Butanolmethode	
5. Polysaccharid- bzw. Teichinsäureisolierung	41
mit Hilfe der Phenylhydrazin- bzw.	
Trichloressigsäureextraktion	
6. Untersuchungen des CKF und der verschie-	42
denen Polysaccharidpräparate auf	
Präcipitine	
D. DISKUSSION	43
E. ZUSAMMENFASSUNG	48
F. LITERATURVERZEICHNIS	52

A. PROBLEMSTELLUNG

Aus einer Reihe klinischer und experimenteller Untersuchungen (Literatur bei SCHRÖPL 1966) wird die Bedeutung von Mikroorganismen für die Pathogenese eines beträchtlichen Teiles der menschlichen Ekzeme deutlich. Sicher ist ebenfalls die dabei führende Rolle von *Staphylococcus aureus* (St.aureus), die durch eine Vielzahl von Epicutantests (Zusammenstellung der Literatur bei SCHRÖPL 1966) nachgewiesen wurde. SCHRÖPL (1966) berichtete ausführlich über die Brauchbarkeit von Staphylokokkenkulturfiltraten, insbesondere des Cellophankulturfiltrates (CKF) als Ausgangsmaterial, das die ekzematogenen Substanzen enthält und keine störenden Einflüsse durch unspezifische Nährmedienbestandteile ausübt. An gleicher Stelle wurde die Spezifität und der Aussagewert des Läppchentests als klinischer Indikator für die Entstehung einer ekzematösen Reaktion diskutiert. Danach sind das CKF mit gewissen Vorbehalten und der Epicutantest als geeignet anzusehen.

Die größte Problematik für die Bewertung der Testreaktionen und der Lösung des Problems der mikrobiellen Allergie überhaupt wurde in der Unkenntnis der wirksamen Substanzen gesehen (RAJKA, KOROSSY und GOZONY 1962; SCHRÖPL 1966). In einer Reihe von Untersuchungen wurde deshalb von SCHRÖPL (1966) versucht, einer Isolierung und Identifizierung der in den Kulturfiltraten von *St. aureus* enthaltenen ekzematogenen Substanzen näherzukommen. Diese Untersuchungen wurden in der vorliegenden Arbeit in Richtung auf die Reindarstellung einer ekzematogenen, niedermolekularen Komponente

fortgesetzt. Die Bedeutung solcher Studien geht schon daraus hervor, daß immer wieder (zuletzt von GAHLEN 1966) versucht wurde, die naturgemäß (Gehalt an unspezifischen hautschädigenden Stoffen) noch zu geringe Spezifität der Tests als Beweis für die Nichtexistenz eines mikrobiellen Ekzems heranzuziehen.

Vor der Mitteilung eigener Untersuchungsergebnisse soll auf bereits bekannte Eigenschaften der möglichen ekzemauslösenden Stoffe und die bisher bekannten Zellwandbestandteile von *St. aureus* eingegangen werden. Dabei finden innerhalb der Polysaccharidkomponente die Teichinsäuren (TS) ¹⁾ als mögliches Substrat der ekzematogenen Wirksamkeit ausführlichere Berücksichtigung.

1) Im Schrifttum finden sich die Bezeichnungen Teichinsäure, Teichosäure und Teichonsäure. In Anlehnung an RAUEN (1964) wird hier die Version Teichinsäure verwendet.

B. LITERATURÜBERSICHT

I. Bisher bekannte Eigenschaften der ekzem- auslösenden Stoffe von St. aureus

ROBERT (1937) testete mit Ammoniumsulfat- bzw. Äthanol-
fällungsprodukten von St.-Bouillonkulturfiltraten und
vermutete, daß möglicherweise z w e i verschiedene
aktive Komponenten vorhanden seien. Da die Reaktions-
häufigkeit auf die Äthanolfraktion ungleich (65 : 17 %)
höher war als auf das Ammoniumsulfatpräcipitat, nahm er an,
daß es sich um eine kohlenhydratartige Substanz handle.
MIESCHER, LINCKE und STORCK (1948) schlossen aus dem Ver-
halten ihrer wirksamen Fraktion (Ammoniumsulfatfällung)
auf das Vorliegen eines Eiweißkörpers, wahrscheinlich von
Albumincharakter. Die trichloressigsäurelösliche Komponente
wurde anscheinend vernachlässigt. Äthanol- und Aceton-
fällungen ergaben nur geringe Ausbeuten. Nachdem MEYER-ROHN
und SCHRÖDER (1953) zunächst mitteilten, daß das aktive
Prinzip offenbar durch Erhitzen auf 56° C nicht zerstört
würde, arbeiteten MEYER-ROHN und ROHDE (1959) mit Phenol-
extrakten aus ganzen Zellen. Auch ihre Ergebnisse sprachen
für das Vorliegen mehrerer aktiver Substanzen, wobei die
wasserlösliche Phase häufiger ekzematöse Reaktionen hervor-
rief.

Nach diesen Untersuchungen ergab sich folgendes Bild:
Übereinstimmend wurden mehrere wirksame Stoffe in den Kul-
turfiltrat- bzw. Bakterienzellpräparaten gefunden, die mit
Ammoniumsulfat bzw. Äthanol fällbar, in Wasser löslich,
in Trichloressigsäure unlöslich waren. Sie waren offenbar

nicht dialysabel, wurden durch erhöhte Temperatur nicht beeinträchtigt, durch Salzsäure und Pepsin jedoch zerstört.

SCHRÖPL (1966) isolierte aus Cellophankulturfiltrat von *St. aureus* zunächst durch Ultrafiltration einen hoch- und einen niedermolekularen aktiven Stoff. Die ultrafiltrable Fraktion rief in einem höheren Prozentsatz Reaktionen hervor als der hochmolekulare Stoff, und zwar signifikant häufiger bei Ekzematikern. Eine Identität des in dieser niedermolekularen Fraktion enthaltenen ekzematogenen Stoffes mit einem der bekannten Toxine von *St. aureus* konnte ausgeschlossen werden. Bei intracutanen Tests im Tierversuch fanden sich keine Spätreaktionen. Sera von Patienten, die im Epicutantest positiv reagierten, zeigten im Agargeldiffusionstest keine durch das Ultrafiltrat hervorgerufenen Präcipitationslinien. Im Tierversuch gelang es nicht, präcipitierende Antikörper isoliert gegen das Ultrafiltrat zu erzeugen. Mit Hilfe von papierchromatographischen und papierelektrophoretischen Untersuchungen kamen in der ungereinigten ultrafiltrablen Fraktion zwei ninhydrin-, eine amidoschwarz- und zwei mucicarminpositive Fraktionen zur Darstellung. Nach weiterer Reinigung des Materials durch zusätzliche Gelfiltration und anschließende Äthanol-fällung ergab sich eine gut wasserlösliche Substanz, die elektrophoretisch einheitlich war, im alkalischen Milieu anodisch wanderte und sich mit Mucicarmin und Toluidinblau anfärben ließ. Das UV-Spektrum war uncharakteristisch und zeigte insbesondere bei 240 - 280 nm keine Maxima. Das Molekulargewicht wurde auf 6 - 8000 geschätzt. Die Wirksamkeit im Epicutantest wurde durch proteolytische Fermente nicht beeinträchtigt.-

Alle diese Daten sprachen für das Vorliegen eines Polysaccharids. SCHRÖPL (1966) kam abschließend nach Vergleich mit den in Frage kommenden Substanzen von *St. aureus* zu dem Schluß, daß es sich bei seiner gereinigten niedermolekularen, ekzematogenen Fraktion um ein Kohlenhydrat und zwar um eine Teichinsäure oder doch um einen ähnlichen Stoff handeln müsse. Die hochmolekulare Fraktion SCHRÖPLs wurde mit der von MIESCHER, LINCKE und STORCK (1948) beschriebenen nicht dialysablen, proteinartigen Substanz und der phenollöslichen Phase von MEYER-ROHN und ROHDE (1959) in Beziehung gebracht. Es wurde die Vermutung ausgesprochen, daß es sich dabei um das Mucopeptid handle, und daß auch die Peptidkomponente ekzematogen aktiv sei.

Da die Kohlenhydrate hauptsächlich in den Zellwänden der Keime lokalisiert sind, wird in dem folgenden Abschnitt eine kurze Übersicht über die Zusammensetzung der Zellwand von *St. aureus* gegeben.

II. Zellwandbestandteile von *St. aureus*

Die Zellwände von *St. aureus* enthalten mindestens zwei verschiedene Typen von Polymeren: Die Ribitol ¹⁾ - TS, auf die in einem späteren Kapitel ausführlich eingegangen wird, und das Glycosaminopeptid ²⁾, das nach WORK (1957)

1) In der Literatur sind neben dem Ausdruck Ribitol auch die Bezeichnungen Ribit und Adonit zu finden.

2) Für diese Wandkomponente sind im Schrifttum verschiedene Synonyme gebräuchlich. In der vorliegenden Arbeit finden die Ausdrücke Mucopeptid (MANDELSTAM und ROGERS 1959), der sich eingebürgert hat, und Glycosaminopeptid (JEANLOZ 1960), der chemisch präziser ist, gleichberechtigte Anwendung.

das starre Gerüst der Bakterienwände darstellt und chemischen Einflüssen gegenüber sehr resistent ist. Wegen des hohen Gehaltes an Glycin, der für *St. aureus*-Wände eigentümlich ist, erhob sich die Frage, ob das Glycinpolymer als ein Teil des Glycosaminopeptids oder eine getrennte Peptidgruppierung anzusehen sei. MANDELSTAM und STROMINGER (1961) kamen bei ihren Untersuchungen der Bakterienwand von *St. aureus* (Stamm Copenhagen) zu dem Ergebnis, daß drei Polymerketten vorliegen müßten: Das Glycopeptidgerüst, die Polyglycinkette und das Ribitolphosphatpolymer. Die Polyglycinkette sollte dabei benachbarte Peptidketten zwischen Lysin und Glutaminsäure verbinden (Abb. 1).

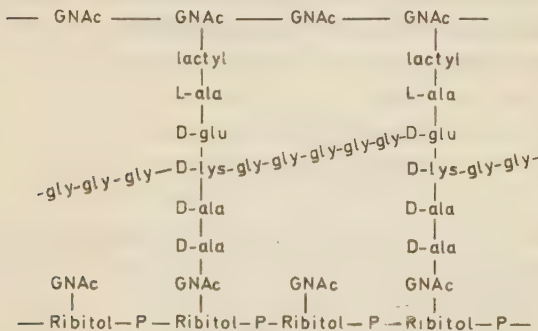


Abb. 1 Strukturvorschlag für die *St. aureus* (Copenhagen) -Zellwand nach MANDELSTAM und STROMINGER (1961)

Diese und spätere Untersuchungen über die Zusammensetzung der Glycosaminopeptidkomponente ergaben, daß das Peptid

aus Alanin, Glutaminsäure, Glycin und Lysin besteht (MANDELSTAM und STROMINGER 1961; GHUYSEN, DIERICKX, LEYH-BOUILLE et al. 1965; GHUYSEN, TIPPER, BIRGE et al. 1965) und an ein Disaccharid aus N-Acetylglucosamin und N-Acetylmuraminsäure ¹⁾ gebunden ist. Einzelne Disaccharideinheiten sind in 6-Stellung durch eine O-Acetylgruppe substituiert (GHUYSEN und STROMINGER 1963b; GHUYSEN, TIPPER und STROMINGER 1965 (Abb.2), TIPPER, GHUYSEN und STROMINGER 1965; TIPPER und STROMINGER 1966).

AN INTERPRETATION OF CELL WALL STRUCTURE AND THE ORIGIN OF THE TEICHOIC ACID-GLYCOPEPTIDE COMPLEXES

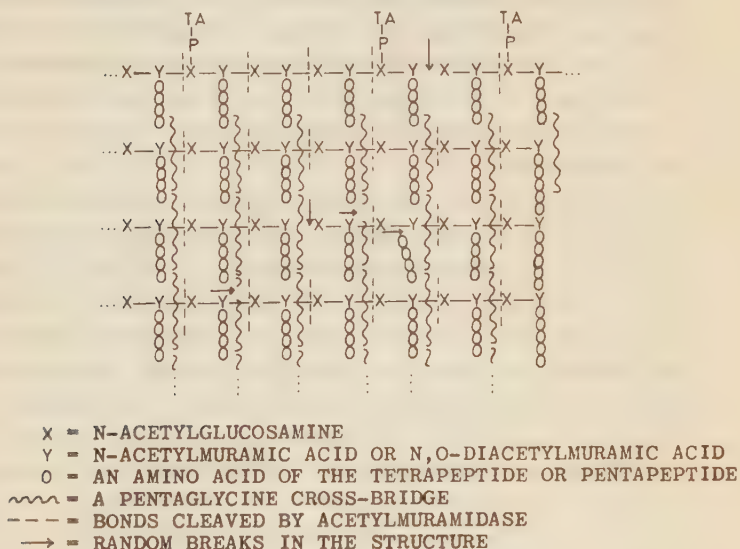


Abb. 2 Strukturvorschlag für die Zellwandstruktur von *St. aureus* nach GHUYSEN, TIPPER und STROMINGER (1965)

¹⁾ Muraminsäure = 2-Amino-2-Desoxy-3-O-(α -D-Carboxyäthyl)-D-Glucose = 3-O-Lactylglucosamin (STRANGE 1956; STRANGE und KENT 1959).

Nach STROMINGER (1962) macht das Glycosaminopeptid bei einigen *St. aureus*-Stämmen bis zu 80 % des Gewichtes aus. Die Frage einer eventuellen immunologischen Bedeutung des Glycosaminopeptids ist gegenwärtig noch nicht endgültig geklärt. ABDULLA und SCHWAB (1965) berichteten, daß es ihnen gelungen sei, für mehrere Streptokokkenstämme und *St. albus* die antigene Wirksamkeit des Zellwandmucopeptids nachzuweisen und spezifische Antikörper dagegen zu produzieren. Nahezu alle untersuchten Tiersera hätten dabei mit den verschiedenen Mucopeptidpräparaten reagiert, was auf eine natürliche immunologische Reaktion gegen eine weit verbreitete antigen wirksame Gruppierung, die einer Vielzahl von mikrobiellen Mucopeptiden gemeinsam sei, hindeute. HISATSUNE, DE-COUREY jr. und MUDD (1966) berichteten von einem immunologisch aktiven Zellwandpeptid, das von Kulturfiltraten von *St. aureus* gewonnen wurde und aus den Aminosäuren Glutaminsäure, Lysin, Alanin und Glycin bestand.

Weitere Oligo- bzw. Polysaccharidkomponenten wurden für *St. aureus* nicht nachgewiesen (SALTON 1964). Ein Lipidanteil in *St. aureus*-Wänden wurde von FEW (1955) beschrieben. Das Material wurde aus "Bakterienhüllen", von den Zellwänden und aus "small partite fractions" gewonnen und soll maximal 0,8 % des Trockengewichts der Wände ausmachen, so daß analytische Untersuchungen nicht möglich waren.

III. Polysaccharidfraktion von St. aureus

JULIANELLE und WIEGHARD (1934) beschrieben eine antigen wirksame, "typenspezifische" Kohlenhydratkomponente von pathogenen Staphylokokken, das Polysaccharid A, das von WIEGHARD und JULIANELLE (1935) bis zu einem gewissen Grade chemisch charakterisiert wurde. Es gelang nicht, gegen die isolierte Kohlenhydratfraktion in Tiersera Antikörper hervorzurufen. Dagegen wurden solche in Sera von Patienten, die schwere, protrahierte oder generalisierte Staphylokokkeninfekte in der Anamnese aufwiesen, gefunden. Ebenso zeigten derartige Patienten cutane Überempfindlichkeitsreaktionen vom Soforttyp auf Polysaccharid A (JULIANELLE und HARTMANN 1936), die den später von STROMINGER (1962b) erwähnten Reaktionen auf isolierte TS entsprachen. KAHN, BALDWIN, ZEITLIN und SMART (1951) berichteten von Hautreaktionen u.a. auf eine Polysaccharidfraktion aus St. aureus-Extrakten, die bei sensibilisierten Personen häufiger als bei gesunden Kontrollpersonen auftraten. Bei BEISER, DWORETZKY, SMART und BALDWIN (1953) wurden präcipitierende Antikörper gegen Kulturfiltrate und Bakterienextrakte von St. aureus in Humansera beschrieben.

HAUKENES (1962) führte eingehende chemische und serologische Untersuchungen mit Polysaccharidfraktionen zweier St. aureus-Stämme durch, die sich als identisch mit dem Polysaccharid A JULIANELLES erwiesen und in 97 % der von ihm untersuchten pathogenen Staphylokokken vorhanden waren. Bei vergleichenden Untersuchungen der Hydrolyseprodukte und des serologischen Verhaltens mit der St. aureus-TS (Stamm H) kam HAUKENES zu dem Ergebnis, daß das Polysaccharid aus den Bestandteilen

der Zellwand, nämlich der Ribitol-TS und einer Mucopeptidkomponente, zusammengesetzt sei, wobei quantitativ die TS den größeren Anteil ausmache (HAUKENES, ELLWOOD, BADDILEY und OEDING 1961; HAUKENES 1962). Im Agargelpräzipitationstest von *St. aureus*-Gesamtpräparaten gegen Staphylokokkenantisera fanden sich u.a. regelmäßig zwei charakteristische und leicht diagnostizierbare Präzipitationslinien (Abb. 3): Die Antigen A (JENSEN) - Linie und die serumnahe Polysaccharid A-Linie (OEDING 1960; HAUKENES, LOSNEGARD und OEDING 1961; HAUKENES 1962; OEDING und HAUKENES 1963).

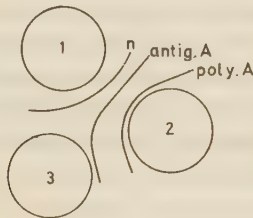


Abb. 3 Die wichtigsten Präzipitationslinien im Agargeldiffusionstest von *St. aureus* gegen Staphylokokkenantisera nach OEDING und HAUKENES (1963)

Ein Faktorserum gegen Polysaccharid A konnte nicht erzeugt werden, weshalb vermutet wurde, daß die Substanz Haptencharakter besitze. In Sera von Patienten, die sicher Staphylokokkeninfekte durchgemacht hatten, wurden von HAUKENES keine spezifischen Polysaccharid-A-Antikörper nachgewiesen.

IV. Teichinsäuren

1. Übersicht

Erste Hinweise auf die Existenz von Polyphosphatpolymeren in Mikroorganismen wurden in Arbeiten von PARK (1952), MITCHELL und MOYLE (1951), BADDILEY und MATHIAS (1954), BADDILEY, BUCHANAN, CARSS und MATHIAS (1956), BADDILEY, BUCHANAN, CARSS, MATHIAS und SANDERSON (1956) bei Untersuchungen über Zellwandnucleotide von Bakterien gegeben. Unter den Hydrolyseprodukten fanden sich neben Cytidindiphosphat (CDP)-haltigen Substanzen Ribitol- und Glycerophosphatbruchstücke (BADDILEY, BUCHANAN und CARSS 1957 a u.b und 1958). In späteren Arbeiten (BADDILEY, BUCHANAN und SANDERSON 1958; BADDILEY, BUCHANAN und FAWZETT 1959) wurden diese Substanzen strukturell aufgeklärt und ihre mögliche Rolle für die Synthese der Polyphosphatpolymere bzw. der Zellwand überhaupt erörtert (PARK und STROMINGER 1957; ARMSTRONG, BADDILEY, BUCHANAN und CARSS 1958; STROMINGER, PARK und THOMPSON 1959; BADDILEY 1959; STROMINGER 1962a). ARMSTRONG, BADDILEY, BUCHANAN, CARSS und GREENBERG isolierten 1958 Polymere vom Ribitol- und Glycerophosphattyp aus Trichloressigsäureextrakten von *Lactobacillus arabinosus* und prägten den Sammelbegriff "Teichinsäure", weil zunächst angenommen wurde, daß die Polyalkolphosphatderivate auf die Zellwand der Mikroorganismen beschränkt seien. In der Folgezeit wurde die Verteilung der durch Trichloressigsäureextraktion und Äthanol-fällung gewonnenen Ribitol- bzw. Glycerots in verschiedenen Mikroorganismen untersucht (ARMSTRONG, BADDILEY, BUCHANAN, DAVISON, KELEMEN und NEUHAUS 1959, (Abb. 4), SALTON und PAVLIK 1960; BADDILEY 1961; IKAWA 1961; BADDILEY, BUCHANAN, MARTIN und RAJ BHANDARY 1962).

Distribution of teichoic acids in bacterial cell walls

	Type of polymer	
	Glycerol	Ribitol
<i>Lactobacillus arabinosus</i> 17-5	-	+
<i>L. casei</i> (A.T.C. 7469)	+	-
<i>L. delbrückii</i> (N.C.I.B. 8608)	+	-
<i>L. bulgaricus</i> (N.C.I.B. 76)	+	-
<i>Staphylococcus aureus</i> H	tr.	+
<i>Staph. aureus</i> (Duncan)	tr.	+
<i>Staph. aureus</i> (Oxford)	+	+
<i>Staph. citreus</i>	+	-
<i>Staph. albus</i> (N.C.T.C. 7944)	+	-
<i>Bacillus subtilis</i> (vegetative form)	-	+
<i>Escherichia coli</i> (Type B)	tr.	-
<i>Corynebacterium xerosis</i>	+	-
<i>Streptococcus faecalis</i> (A.T.C. 9790)	+	+

Abb. 4 Verteilung der Teichinsäuren in verschiedenen Bakterien nach ARMSTRONG, BADDILEY, BUCHANAN, DAVISON, KELEMEN und NEUHAUS (1959)

Die quantitative Bestimmung des TS-Gehaltes erfolgte durch Messung der Formaldehydkonzentration nach Perjodatodoxydation bzw. Bestimmung des Phosphatgehaltes unter der Annahme, daß das Phosphat in den Mikroorganismen nur in Form der Polyalkoholphosphate vorlag (BADDILEY 1962 a u. b). Gute Ausbeuten an TS wurden neuerdings durch Behandlung mit Phenylhydrazin erzielt (ARCHIBALD und BADDILEY 1965).

Über die in vivo- und in vitro-Synthese der Wand-TS liegen inzwischen einige Untersuchungsergebnisse vor. Die aus älteren Arbeiten bekannten Glycero- und Ribitolnucleotide aus Staphylokokkenzellwänden wurden in ihrer Bedeutung für die TS-Synthese erkannt. Studien zur enzymatischen Synthese der N-Acetylglucosaminy-Ribitol-Gruppierung führten NATHENSON und STROMINGER (1962 und 1963), BURGER und GLASER (1964), GLASER (1964 und 1965) sowie NATHENSON, ISHIMOTO, SANDERSON und STROMINGER (1966) aus. ISHIMOTO und STROMINGER (1966)

katalysierten mit Hilfe eines von *St. aureus* isolierten Enzyms die Synthese von Polyribitolphosphat aus seinen Vorstufen. Versuche zur Blockierung der Biosynthese der TS- bzw. Mucopeptidkomponente wurden von ROGERS und GARRETT (1965) ausgeführt.

2. Funktion

Die funktionelle Bedeutung der TS als Zellwand- bzw. Protoplasmakomponenten ist noch weitgehend unklar. Sicher ist, daß die Wand-TS keinerlei Bedeutung für die mechanische Wandstruktur der Bakterien besitzen, sie scheinen in dieser Beziehung keine essentiellen Komponenten zu sein (ARMSTRONG, BADDILEY und BUCHANAN 1960; ARCHIBALD, ARMSTRONG, BADDILEY und HAY 1961). Nach ihrer oberflächennahen Lokalisation und ihren immunologischen Eigenschaften wird angenommen, daß sie wichtige Antigene (bzw. Haptene) darstellen (HAUKENES, ELLWOOD, BADDILEY und OEDING 1961; SANDERSON, JUERGENSEN und STROMINGER 1961). Von einigen Autoren wurden Beziehungen zur Ionenpassage durch die Zellwand nach Art einer Regulatorfunktion angenommen (ARCHIBALD, ARMSTRONG, BADDILEY und HAY 1961). In diesem Zusammenhang wurde auch die beobachtete höhere Resistenz von Bakterien, deren Wände reich an TS sind, gegenüber unphysiologischen Säure- oder Salzkonzentrationen zu erklären versucht. Die Funktion der intrazellulären TS (siehe weiter unten) ist ebenso unbekannt. Ihre Lokalisation wird zwischen Zellwand und Protoplastenmembran angenommen (HAY, WICKEN und BADDILEY 1963). BAILLIE und HOLMS (1966) nahmen nach ihren Untersuchungen an *Bacillus megatherium* die Bedeutung der intrazellulären TS als wichtig für das Bestehen einer unspezifischen Permeabilitätsschranke für bestimmte Moleküle an.

3. Allgemeine Struktur

Die TS enthalten folgende gemeinsame Grundbausteine:

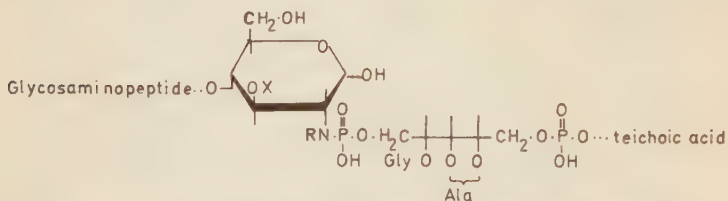
Einen esterartig an einen Zuckerrest gebundenen D-Alaninrest, einen Zucker- bzw. Aminozyuckerrest und Phosphodiesterbrücken. Nach ARMSTRONG, BADDILEY, BUCHANAN, DAVISON, KELEMEN und NEUHAUS (1959) werden folgende drei Strukturtypen unterschieden:

- a) D-Alanyl-Glucosyl-Ribitolphosphat (Prototyp: Wand-TS von *Bacillus subtilis*),
- b) D-Alanyl-N-Acetylglucosaminyl-Ribitolphosphat (Prototyp: Wand-TS von *St. aureus*),
- c) D-Alanyl-Glycerophosphat bzw. D-Alanyl-Glucosaminyl-Glycerophosphat (Prototyp: Intrazelluläre TS).

4. Bindung der Teichinsäure an die Basalstruktur (Mucopeptid)

ARMSTRONG, BADDILEY, BUCHANAN, CARSS und GREENBERG (1958) nahmen auf Grund der Extrahierbarkeit der Wand-TS mit kalter, verdünnter Trichloressigsäure an, daß diese an die übrigen Zellwandstrukturen salzartig oder in Form von H-Brücken gebunden seien. Von GHUYSEN (1961) wurde das Vorliegen eines "TS-Mucopeptidkomplexes" beschrieben und durch Hydrolyseuntersuchungen eingehender studiert (ARCHIBALD, ARMSTRONG, BADDILEY und HAY 1961; MANDELSTAM und STROMINGER 1961; HAUKENES 1962; GHUYSEN und STROMINGER 1963 a; GHUYSEN, TIPPER, BIRGE et al. 1965; ROGERS und GARRETT 1965). Die Art der TS-Glycosaminopeptidbindung wurde durch verschiedene, zum Teil enzymatische Hydrolyseuntersuchungen näher zu definieren versucht.

Sicher war zunächst nur, daß einfache Bindungen in Frage kamen und daß das Alanin der TS nicht in die Bindung einbezogen war (ARCHIBALD, ARMSTRONG, BADDILEY und HAY 1961; ROGERS und GARRETT 1963). Nach GHUYSEN und STROMINGER (1963a) kamen am ehesten Phosphodiesterbindungen zwischen der TS und dem Glycosaminopeptid in Frage. Ein Strukturvorschlag von ARCHIBALD und BADDILEY (1965) (Abb. 5) beruhte auf der Annahme, daß der endständige Phosphatrest der TS (STROMINGER und GHUYSEN 1963; YOUNG, TIPPER und STROMINGER 1964; GHUYSEN, TIPPER und STROMINGER 1965) an das Glycosaminopeptid entweder an der Halbacetalhydroxylgruppe des endständigen Zuckerrestes oder in Form einer Phosphoramidatbindung an eine Aminogruppe desselben gebunden sei (HAY, ARCHIBALD und BADDILEY 1965; HAY, DAVEY, ARCHIBALD und BADDILEY 1965).



X=H or lactyl peptide; R=H or CH_3CO ; Gly=glucosyl or N-acetylglucosaminy; Ala= D-alanyl

Abb. 5 Strukturvorschlag für die Glycosamino-peptid-Teichinsäure-Bindung nach ARCHIBALD und BADDILEY (1965)

Es muß darauf hingewiesen werden, daß die endgültige Strukturaufklärung der TS-Glycosaminopeptidbindung noch aussteht (BUTTON, ARCHIBALD und BADDILEY 1966).

5. Wandteichinsäuren einzelner Bakterienarten

a) *Bacillus subtilis*

Wie zahlreiche Untersuchungen ergeben haben, besteht die Wand-TS von *Bacillus subtilis* (Abb. 6) aus neun D-Alanyl-Glucosyl-Ribitolphosphateinheiten, die über 1-5-Phosphodiesterbrücken miteinander verbunden sind. Der D-Alanylrest ist dabei in 2- oder 3-Stellung esterartig an das Ribitol gebunden (ARMSTRONG, BADDILEY und BUCHANAN 1960 und 1961; BADDILEY, BUCHANAN und HARDY 1961; SARGENT, BUCHANAN und BADDILEY 1962). Aus dem Phosphatgehalt wurde der TS-Anteil der Wände auf ca. 40 - 60 % geschätzt (ARMSTRONG, BADDILEY, BUCHANAN, CARSS und GREENBERG 1958).

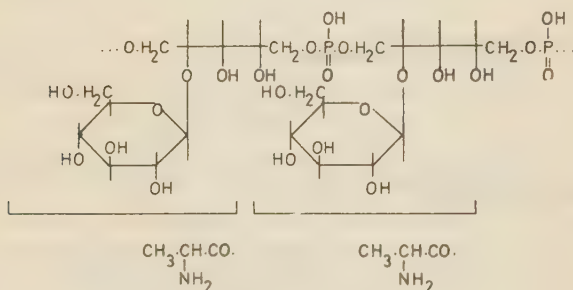


Abb. 6 Vereinfachte Darstellung der Struktur der Wand-Teichinsäure von *B. subtilis* nach ARMSTRONG, BADDILEY und BUCHANAN (1960)

b) *Lactobacillus arabinosus*

Die Wand-TS von *Lactobacillus arabinosus* (Abb. 7) besteht aus 7 - 8 Ribitolphosphateinheiten, die in 2- bzw. 3-Stellung des Ribitols einen D-Alanin- bzw. ein oder zwei Glucosereste in α -Stellung tragen und in 1-5-Stellung über Phosphodiesterbrücken verknüpft sind (BADDILEY, BUCHANAN und CARSS 1958; ARMSTRONG, BADDILEY, BUCHANAN, CARSS und GREENBERG 1958; ARCHIBALD, BADDILEY und BUCHANAN 1961; BADDILEY und DAVISON 1961; BADDILEY 1962 a u.b; SARGENT, BUCHANAN und BADDILEY 1962). Der TS-Gehalt der Wände wurde auf über 80 % geschätzt.

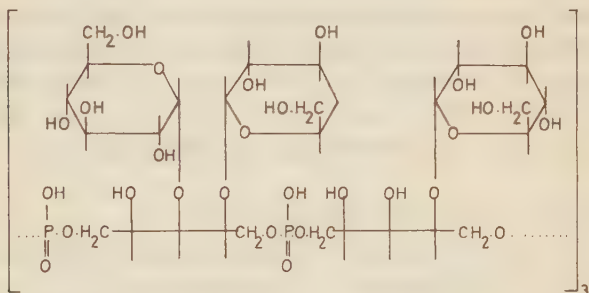


Abb. 7 Vereinfachte Darstellung der Struktur der Wandteichinsäure von *Lactobacillus arabinosus* nach SALTON (1964)

In verschiedenen anderen *Lactobacilli* (*casei*, *delbruecki*, *bulgarici*) wurde nur Glycero-TS gefunden (ARMSTRONG, BADDILEY, BUCHANAN, DAVISON, KELEMEN und NEUHAUS 1959; BADDILEY und DAVISON 1961). Die TS von *Lactobacillus buchneri* NCIB 8007 besteht aus ca. 14 Glycerophosphateinheiten und soll 30 % des Trockengewichtes der Bakterienwand ausmachen (SHAW und BADDILEY 1964).

c) Streptokokken

Bei Streptokokken der Gruppe A wurde eine Glycero-TS nachgewiesen (McCARTY 1956, 1958, 1965). Bei Streptokokken der Gruppe D soll das typenspezifische Zellwandkohlenhydrat mit einem Glucosyl-Glycerophosphatpolymer identisch sein (ELLIOTT 1962; WICKEN, ELLIOTT und BADDILEY 1963). Streptococcus faecalis-Stämme enthalten in der Wand sowohl Ribitol- als auch Glycero-TS (IKAWA 1961). Als Zuckerkomponenten wurden N-Acetylgalactosamin und Glucose gefunden (BADDILEY 1962 a u.b).

d) Bacillus megatherium

Das Vorhandensein von TS-Komponenten in Bacillus megatherium wurde längere Zeit diskutiert (SALTON und MILHAUD 1959; BADDILEY 1961; GHUYSEN 1961; BADILLEY, BUCHANAN, MARTIN und RAJ BHANDARY 1962). Nach neueren Befunden liegt ein Polyalkoholphosphat vom Glycerotyp vor (GHUYSEN 1964).

e) Bacillus stearothermophilus B 65

besitzt eine Glycero-TS in seiner Zellwand, die aus 18 - 19 Einheiten zusammengesetzt ist (WICKEN 1966).

f) Actinomyceten

In Actinomyces streptomycini wird eine Ribitol-TS beschrieben, die u.a. Bernsteinsäure, Glucose und Glucosamin enthält (NAUMOW, SHABAROVA und BELOSERSKI 1963). Aus Actinomyces rimosus T 118 und Actinomyces antibioticus 39 wurden Glycero-TS isoliert (NAUMOW und SARETZKAJA 1964).

g) Gramnegative Bakterien

Bisher wurden nur für *Escherichia coli* TS-ähnliche Hydrolyseprodukte nachgewiesen. LILLY (1962) fand Ribitolphosphat, Glucose und alle Aminosäuren, die im Mucopeptid vorkommen, in entsprechenden Präparaten von *E. coli* 26 - 26.

h) Ähnliche Kapselpolysaccharide

Einige Autoren beschrieben typenspezifische Substanzen in Pneumokokkenkapseln, die u.a. Ribitolphosphat enthielten, sich aber durch das Fehlen des charakteristischen Alaninrestes und anderer Merkmale von den TS unterscheiden ließen. In diesen Kapselpräparaten fand sich ein Polysaccharid, das im wesentlichen aus Galactose, Glucose und Rhamnose zusammengesetzt war (REBERS und HEIDELBERGER 1959 und 1961; SHABAROVA, BUCHANAN und BADDILEY 1962; SHABAROVA, HUGHES und BADDILEY 1962; ROBERTS, BUCHANAN und BADDILEY 1963).

6. Intrazelluläre Teichinsäuren

Die Feststellung, daß Substanzen, die die chemischen Merkmale von TS aufweisen, auch im Protoplasma einiger Bakterienzellen vorkommen, führte zu der verbal widerspruchsvollen Bezeichnung "intrazelluläre Teichinsäuren". Sie sind wahrscheinlich ausschließlich vom Glycerophosphattyp und wurden in vielen Lactobazillen (BADDILEY und DAVISON 1961; KELEMEN und BADDILEY 1961; CRITCHLEY, ARCHIBALD und BADDILEY 1962) und auch in verschiedenen anderen Bakterien nachgewiesen (BADDILEY 1961 und 1962 a u.b). Wahrscheinlich gehört auch ein Polyglycerophosphatantigen aus *Streptococcus A* dazu (McCARTY 1959), nachdem in diesem inzwischen auch D-Alanin-

reste gefunden werden konnten (McCARTY 1965). WICKEN und BADDILEY (1963) beschrieben eine intrazelluläre TS von *Streptococcus faecalis*, die drei Glucosemoleküle am Glycerinrest trägt.

7. Teichinsäure von Staphylokokken

Über das Vorkommen und die Struktur von Zellwand-TS in *Staphylococcus aureus* liegt inzwischen eine Fülle von Untersuchungen vor. Innerhalb der Grundstruktur eines D-Alanin-N-Acetylglucosaminy-Ribitolphosphat-Polymers gibt es stammesspezifische Variationsmöglichkeiten der Einzelsubstituenten, auf Grund deren sich die Staphylokokken taxonomisch und serologisch einordnen lassen (DAVISON und BADDILEY 1963 und 1964). Aus entsprechenden Zellwandpräparaten des Stammes H (Abb. 8) wurde ein aus acht D-Alanyl-4-O-N-Acetylglucosaminy-Ribitolphosphateinheiten, die in 1-5-Stellung durch Phosphodiesterbrücken verbunden sind, bestehendes Polymer isoliert.

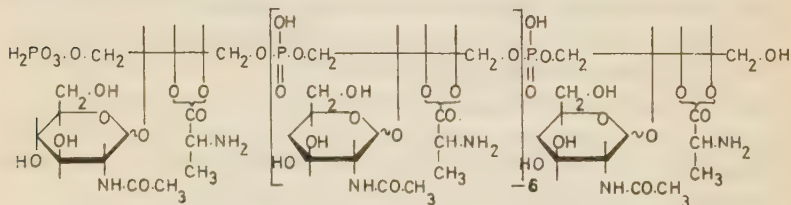


Abb. 8 Vereinfachte Darstellung der Struktur der Wandteichinsäure von *St. aureus* (Stamm H) nach BADDILEY, BUCHANAN, RAJ BHANDARY und SANDERSON (1962)

D-Alanin war an C_2 oder C_3 des Ribitols esterartig gebunden (ARMSTRONG, BADDILEY, BUCHANAN, CARSS und GREENBERG 1958; BADDILEY, BUCHANAN, HARDY, MARTIN, RAJBHANDARY und SANDERSON 1961; BADDILEY, BUCHANAN, RAJ BHANDARY und SANDERSON 1962; MORSE 1962).

Die Wand-TS des Stammes Copenhagen stellt ein Polymer aus 12 - 16 entsprechenden Einheiten D-Alanyl-4-O-N-Acetylglucosaminyl-Ribitolphosphat dar. Die TS-Konzentration der *St. aureus*-Zellwände wird auf 40 - 60 % des Trockengewichtes geschätzt (BADDILEY 1959). Das Molekulargewicht von 5400-7300 stimmt dabei mit der ermittelten Sedimentationskonstanten von 1,13 S überein (NATHENSON und STROMINGER 1962). Möglicherweise kommen auch größere Einheiten vor (HOFSTAD 1964). Zur Konfiguration des Acetylglucosaminrestes, die von immunologischem Interesse ist (s.u.), ist zu sagen, daß die Mehrzahl der Staphylokokkenstämme ein Gemisch von α - und β -N-Acetylglucosaminresten aufweist, einige jedoch nur einen der beiden Konfigurationstypen besitzen (DAVISON, BADDILEY, HOFSTAD, LOSNEGARD und OEDING 1964).

Aus dem Protoplasma von verschiedenen *St. aureus*-Stämmen wurden Glycero-TS isoliert (DAVISON und BADDILEY 1963). Die intrazelluläre TS des Stammes H hat eine Kettenlänge von 15 - 20 Einheiten, die in 1-3-Stellung durch Phosphodiesterbrücken verbunden sind, D-Alaninreste an C_2 und wenige glycosidisch mit Glycerin verknüpfte Zuckerreste aufweisen (RAJ BHANDARY und BADDILEY 1963). Nach YOUNG und BARKER (1964) enthalten die Ribosomen von *St. aureus* (Stamm Duncan) Glycero- und Ribitol-TS.

Staphylococcus albus. Die Zellwand von *St. albus* besitzt eine Glycero-TS. Der von SALTON und PAVLIK (1960) untersuchte Stamm NCTC 7944 enthält N-Acetylgalactosamin, das größten-

teils α -konfiguriert an jedem dritten Glycerinmolekül sitzt. Die Einheiten sind über Phosphodiesterbrücken in 1-3-Stellung typischerweise zu einem aus mehr als 18 Einheiten bestehenden Polymer verknüpft (ARMSTRONG, BADDILEY, BUCHANAN, DAVISON, KELEMEN und NEUHAUS 1959; SALTON und PAVLIK 1960; ELLWOOD, KELEMEN und BADDILEY 1963). Die intrazelluläre TS von *St. albus* ist qualitativ ähnlich aufgebaut, besitzt jedoch weniger Aminosuckeranteile (HAUKENES, ELLWOOD, BADDILEY und OEDING 1961).

Staphylococcus citreus. Auch in Zellwänden von *St. citreus* und *lactis* wurden Glycero-TS gefunden (ARMSTRONG, BADDILEY, BUCHANAN, DAVISON, KELEMEN und NEUHAUS 1959; ARCHIBALD, BADDILEY und BUTTON 1965).

2. Immunologische Eigenschaften der *Staphylococcus aureus* - Teichinsäure

Das Polysaccharid A von *St. aureus* von JULIANELLE und WIEGHARD (1934) bzw. HAUKENES (1962) stellt, wie bereits erwähnt, einen wichtigen Teil des immunochemischen Substrates der Zellwände dieser Mikroorganismen dar. Durch vergleichende Untersuchungen wurde gezeigt, daß sich die Polysaccharidfraktion und die isolierte TS immunologisch identisch verhalten und chemisch durch die Mucopeptidkomponente unterscheiden. Beide Fraktionen zeigten im Ringtest bis zu einem Titer von $1 : 4 \times 10^6$ deutliche Präcipitationslinien und im Agardiffusionstest scharfe, charakteristische Polysaccharidlinien (HAUKENES, ELLWOOD, BADDILEY und OEDING 1961). Es gelang nicht, gegen die isolierte TS spezifische Antikörper in Tiersera zu erzeugen. Der Nachweis von Antikörpern in Humansera mißlang zunächst ebenfalls.

SINGLETON, ROSS und KOHN (1964) fanden durch immunoelektrophoretische Untersuchungen in Sera von Patienten mit ausgedehnten Verbrennungen, die häufig sehr stark mit *St. aureus* besiedelt sind, Antikörper gegen *St. aureus*-Extrakte. Das korrespondierende Antigen eines dieser Antikörper, von den Autoren auf Grund seines typischen Verhaltens "fast anodic antigen (FAA)" genannt, wurde durch Vergleichsuntersuchungen als TS identifiziert. MARTIN, DAUGHARTY und WHITE (1965) berichteten, daß bei genügend empfindlicher Technik bei den meisten Individuen präcipitierende Antikörper gegen *St. aureus*-TS im Serum nachweisbar waren und bei Patienten mit Staphylokokkeninfekten der Antikörpertiter signifikant höher war. Ihre Intracutantests mit TS zeigten Sofortreaktionen bei allen VP und Wiederauftreten der Reaktionen nach 24 Stunden. Nekrosen traten nur bei infizierten Patienten, die einen Anti-teichinsäuretiters von 1 : 4 und höher aufwiesen, auf.

Der D-Alaninrest erwies sich für die immunologische Aktivität der Substanz als unwesentlich; die Rolle des Glycosaminopeptidanteils ist, wie bereits erwähnt, sehr fraglich. Als eigentlich wirksame Struktur verbleibt also die N-Acetylglucosaminy-Ribitolphosphatgruppierung oder ein Teil derselben (SANDERSON, STROMINGER und NATHENSON 1962). Nach NATHENSON, ISHIMOTO, SANDERSON und STROMINGER (1966) ist dabei für die immunologische Spezifität die Konfiguration dieses wirksamen Restes entscheidend. NATHENSON und STROMINGER (1962) untersuchten verschiedene *St. aureus*-Stämme auf ihren Gehalt an α - bzw. β -konfigurierten TS (Abb. 9).

Strain	Isolated teichoic acid	
	α	β
	%	%
Copenhagen	15	85
H	0 - 5	95 - 100
Duncan	0 - 5	95 - 100
3528	95 - 100	0 - 5

Abb. 9 Konfiguration des N-Acetylglucosaminy-Ribitolphosphatrestes von verschiedenen *St. aureus*-Stämmen nach NATHENSON und STROMINGER (1962)

In *St. aureus* Copenhagen (Abb. 9) betrug das Verhältnis von α - und β -Konfiguration 15 : 85 (SANDERSON, JUERGENS und STROMINGER 1961; SANDERSON, STROMINGER und NATHENSON 1962). JUERGENS, SANDERSON und STROMINGER (1960 und 1963) nahmen nach den Ergebnissen ihrer Agglutinationshemmungsversuche (bei denen die Agglutination von Zellwänden von *St. aureus* (Copenhagen) durch das homologe Antiserum bei Zugabe der entsprechenden TS gehemmt wurde) an, daß die α -konfigurierte 4-O-N-Acetylglucosaminyl-Ribitolphosphateinheit eine bzw. die immunologische Determinante der Zellwand darstelle.

Hohe Titer im Ringtest und Agargeldiffusionstest fanden sich in anderen Stämmen aber auch ohne die Anwesenheit größerer Mengen von α -konfigurierter TS (HAUKENES, ELLWOOD, BADDILEY und OEDING 1961; HAUKENES 1962). MORSE (1962) berichtete, daß in Haemagglutinationsversuchen mit tannisierten Schaferythrocyten, an welche die von *St. aureus* NYH-6-Wänden isolierte TS fixiert war, festgestellt wurde, daß die entscheidende antigene Komponente dieser Stamm-TS das β -N-Acetylglucosaminyl-Ribitolphosphat war. TORII, KABAT und BEZER (1964) fanden in Humansera spezifische präcipitierende Antikörper gegen beide Konfigurationstypen der *St. aureus*-TS auch bei Patienten ohne sichere Staphylokokkeninfektanamnese. Die Autoren nahmen hierfür eine latente Sensibilisierung durch den ubiquitären Kontakt mit diesem weitverbreiteten Keim an. Bei einem Patienten mit sicherer Infektanamnese fanden sie einen höheren Antikörpertiter. Die Injektion von TS bei zwei Versuchspersonen soll zu einem Anstieg des Antikörpertiters geführt haben. Im Präcipitationstest wurde die Anwesenheit von Antikörpern gegen beide Konfigurationstypen der TS getrennt voneinander gezeigt.

MUDD, YOSHIDA, LI und LENHART (1963) zeigten, daß die Phagocytosefähigkeit von Humanleukozyten gegenüber *St. aureus* durch die Zugabe isolierter Wand-TS reduziert wurde.

C. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

I. Material

1. Ausgangsmaterial

Über die Herstellung und Eigenschaften des Cellophankulturfiltrates von *St. aureus* berichteten SCHRÖPL, MÜLLER und RÖCKL (1963) und SCHRÖPL (1966) ausführlich. Im Text wurde, wenn nicht ausdrücklich anders vermerkt, die Bezeichnung CKF für das zehnfach konzentrierte Cellophankulturfiltrat von *St. aureus* verwendet.

2. Versuchspersonen (VP)

Die Epicutantests wurden an insgesamt ca. 360 Patienten der Klinik vorgenommen, die sich wegen verschiedener Dermatosen, überwiegend aber Ekzemen in stationärer bzw. ambulanter Behandlung befanden. Neu eingeführte Testsubstanzen wurden vor der serienmäßigen Anwendung in Selbstversuchen vorgetestet.

3. Versuchstiere

Für Voruntersuchungen wurden Meerschweinchen (Albinos, fremde Zucht, Gewicht 300 - 650 g), zur Herstellung von Immunseren gegen Gesamtstaphylokokken Kaninchen (fremde Zucht, Gewicht 3,3 - 3,9 kg) verwendet. Das Futter der Tiere bestand aus Trockenfutter und Heu.

II. Methodik

1. Epicutantests

Genaue Angaben über die Durchführung der Epicutantests und Auswertung der Testergebnisse wurden von SCHRÖPL, MÜLLER und RÖCKL (1964) gemacht. Die mit Hilfe von Tuberkulinspritzen auf ca. 0,6 cm² große Leinenläppchen aufgetragene Substanzmenge betrug jeweils 0,05 ml.

2. Intracutantests

Die Intracutantests wurden an der rasierten Flankenhaut von Meerschweinchen vorgenommen. Dabei wurden Technik und Bewertungssystem von SCHRÖPL, MÜLLER und RÖCKL (1963) verwendet.

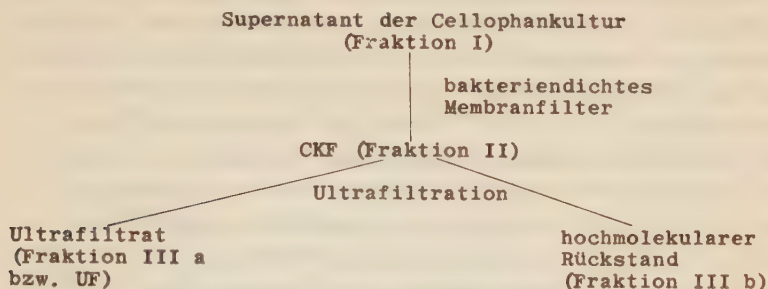
3. Histologische Untersuchungen

Die Probeexcisate wurden mit Hilfe einer Stanze nach Lokalanaesthesie mit Hostacain[®] aus dem Zentrum des Testfeldes entnommen. Die Fixierung erfolgte in BOUINScher Lösung, die Einbettung in üblicher Form in Paraffin (Autotechnikon) und die Färbung mit Haematoxylin-Eosin.

4. Ultrafiltration

Zur Ultrafiltration des CKF wurde ein Metalldruckfiltrationsgerät (Membranfiltergesellschaft Göttingen, Filtertype LSG 60) bei einem Überdruck von 12 atü mit technischem Stickstoff benutzt.

Schematische Darstellung der Ultrafiltration des CKF
(SCHRÖPL 1966):



5. Gelfiltration

Für die Fraktionierung mittels Gelfiltration wurden die Dextrangele Sephadex G 15 bis G 200 (Pharmacia, Uppsala) verwendet. Die Gele wurden drei Tage lang in Wasser zur Quellung gebracht, wiederholt mit Wasser ausgewaschen und in Glaschromatographierohre von 1 m Länge und 2,5 cm Durchmesser eingefüllt. Dabei betrug das Gelbettvolumen 485 ml. Die Elution erfolgte mit Aqua dest. Die Registrierung und Sammlung der Fraktionen wurde mit Hilfe der UV-Absorption (UVICORD, LKB) bei 256 nm und eines Fraktionsteilers (LKB) vorgenommen. Die qualitative Auswertung der Proben erfolgte durch Entnahme von jeweils 0,1 ml aus jedem Röhrchen und Anfärbung mit den spezifischen Sprühreagenzien (Spot Tests), sowie Bestimmung der UV-Absorptionsspektren bei verschiedenen Wellenlängen.

6. Polysaccharidisolierung nach Enteiweißung mit Benzidinhydrochlorid (PS-B).

50 ml CKF (nicht eingeeengt) wurden mit 25 ml frisch bereiteter, gesättigter Benzidinhydrochloridlösung und 2 ml 5 n Salzsäure versetzt und 1 Stunde bei Zimmertemperatur stehengelassen. Anschließend wurde 10 Minuten lang bei etwa 1500 g zentrifu-

giert, der Überstand verworfen und das Sediment mit 10 ml 10 % Ammoniumhydroxydlösung gelöst, quantitativ in einen Schütteltrichter übergeführt und zweimal mit je 50 ml Diäthyläther ausgeschüttelt. Die Ätherphase wurde verworfen und die wässrige Phase mit 0,4 ml gesättigter Kochsalzlösung und 90 ml Äthanol versetzt (Polysaccharidfällung). Der Niederschlag wurde 12 Stunden bei 5° C stehengelassen, anschließend zentrifugiert, der Überstand verworfen und der Rückstand in 50 ml Aqua dest. gelöst. Diese Lösung wurde 3 Tage lang gegen Aqua dest. dialysiert, zur Trockne gebracht und in 5 ml Aqua dest. aufgenommen. Das resultierende Polysaccharidpräparat wurde als "PS-B" bezeichnet.

7. Polysaccharidisolierung nach Enteiweißung mit Chloroform-Butanol (PS-C)

Ein Volumen nicht eingeeengtes CKF wurde unter ständigem Rühren in drei Volumina einer Mischung aus drei Teilen abs. Äthanol und einem Teil Aceton in kleinen Portionen eingebracht (CLOTTEN und CLOTTEN 1962), nach einstündigem Stehen in der Kälte vom Niederschlag abzentrifugiert, das Sediment fünfmal mit je 20 ml Aqua dest. suspendiert, wieder zentrifugiert und die Überstände vereinigt. Nach Einengung mittels Rotationsverdampfer wurde die Lösung achtmal mit Chloroform-Butanol (SEVAG 1934) enteiweißt. Der eiweißfreie Überstand wurde eingeeengt, mit abs. Äthanol versetzt und der weiße Polysaccharidniederschlag in 5 ml Aqua dest. gelöst. Das resultierende Polysaccharidpräparat wurde als "PS-C" bezeichnet.

8. Hydrolyseversuche

Das Polysaccharidpräparat PS-C wurde für den Zuckernachweis 3 Stunden lang bei 100° C mit 2 n Salzsäure, für den Aminosäurennachweis 24 Stunden bei 100° C mit 6 n Salzsäure

hydrolysiert. Die Hydrolyseprodukte wurden mittels Hochspannungselektrophorese aufgetrennt und mit Ninhydrin angefärbt. Die Identifizierung der Aminosäuren erfolgte durch gleichzeitig mitlaufende Vergleichsaminosäuren. Die Zucker wurden mittels absteigender Papierchromatographie aufgetrennt.

9. Andere Methoden zur Polysaccharid- bzw. Teichinsäure-isolierung

Versuche zur Isolierung der TS-Komponente wurden mit Phenylhydrazin (ARCHIBALD und BADDILEY 1965) und mit Hilfe von 10 % kalter, wässriger Trichloressigsäure (ARMSTRONG, BADDILEY, BUCHANAN, CARSS und GREENBERG 1958) durchgeführt.

10. Papierchromatographische Untersuchungen

Zur Auftrennung der Hydrolyseprodukte mittels Papierchromatographie gelangten folgende Fließmittel zur Anwendung:

- a) n-Propanol : Ammoniak (d = 0,9) : Wasser = 6 : 3 : 1
(absteigend)
- b) Äthylacetat : Pyridin : Wasser : Eisessig = 5 : 5 : 3 : 1
(aufsteigend)

Dabei wurde Chromatographiepapier S&S 2043 b verwendet.

11. Elektrophoretische Untersuchungen

Zur Auftrennung der Hydrolyseprodukte mittels Hochspannungselektrophorese (WIELAND und Mitarbeiter 1955; PETER, WIELAND und RAJEWSKY 1961) wurden folgende Pufferlösungen verwendet:

- a) Pyridin-Eisessigpuffer: 100 ml Pyridin + 10 ml Eisessig wurden mit Wasser auf 1000 ml aufgefüllt (p_H 6,0)
- b) Eisessig-Ameisensäurepuffer: 150 ml Eisessig + 50 ml Ameisensäure wurden mit Wasser auf 1000 ml aufgefüllt (p_H 1,9).

Daten der Apparatur (Pherograph Frankfurt) unter Versuchsbedingungen: 1300 V, 8 mA, 33 V/cm, Laufzeit 2 Stunden bzw. 1800 V, 60 mA, 45 V/cm, Laufzeit 4 Stunden.

12. Färbemethoden (HAIS und MACEK 1958)

- a) Zuckerfärbung: 4,5 g Silbernitrat wurden in 10 ml Wasser gelöst und unter Schütteln zu 200 ml Aceton p.a. gegeben (Reagenz 1). 10 g Natriumhydroxyd p.a. wurden in 10 ml Wasser gelöst und in kleinen Portionen unter sehr kräftigem Schütteln zu 485 ml abs. Äthanol hinzugefügt (Reagenz 2). Die Chromatogramme wurden nacheinander durch beide Reagenzien gezogen und bei Zimmertemperatur getrocknet. Innerhalb von 15 - 20 Minuten wurden die Flecken der Monosaccharide, Aminosucker und Zuckeralkohole sichtbar (PARTRIDGE 1946).
- b) Aminosäurefärbung: Mit 0,5 % Lösung von Ninhydrin in n-Butanol : Pyridin = 100 : 5
- c) Proteinfärbung: Amidoschwarz 10 B
- d) Polysaccharidfärbung: Mit einer Lösung von 5 ml Mucicarmin (MAYER) in 17 ml abs. Äthanol und 3 ml Wasser.

13. Immunologische Untersuchungen

- a) Immunisierungsverfahren: Immunsera wurden in der von OEDING (1957) angegebenen Weise von Kaninchen gewonnen. Abweichend von der zitierten Methode wurde eine 18 Stunden alte Mischkultur der für die CKF-Herstellung benutzten zehn Staphylokokkenstämme angelegt und daraus eine Suspension von ca. 5×10^9 Keimen/ml 0,4 % Formalin-Kochsalzlösung hergestellt. Die Keimzahlbestimmung

erfolgte nach WRIGHT. Nach Sterilitätskontrollen wurde die Suspension steril in Ampullen abgefüllt und bei 0° C. aufbewahrt. Vor der Injektion wurden von jedem Versuchstier 2 ml Venenblut zur Gewinnung von Kontrollsera abgenommen, weil nach COHEN, COWART und CHERRY (1961) gelegentlich bei nicht immunisierten Kaninchen präzipitierende Antikörper gegen Staphylokokken nachgewiesen wurden.

Eine Titererhöhung durch weitergehende Immunisierung als von OEDING (1957) angegeben bzw. Simultangabe von komplettem FREUNDSchen Adjuvans (DIFCO) wurde nicht erzielt.

- b) Agargeldiffusion: Der Nachweis von Präcipitinen in den einzelnen Präparaten wurde mit Hilfe des Agargeldiffusionstestes auf Objektträgern (OUCHTERLONY 1949) geführt.
- c) Immunoelektrophorese: Die Auftrennung erfolgte nach der Methode von GRABAR und WILLIAMS (1953 und 1955), modifiziert nach SCHEIDEGGER (1955), wobei jeweils 3 ml 1,5 % Agar auf die Objektträger aufgetragen wurden (Gerät: Bender und Hobein, München).

14. Arbeitstemperatur

Wenn nicht anders angegeben, wurde bei Zimmertemperatur gearbeitet. Die Aufbewahrung der Testsubstanzen erfolgte bei -18° C.

III. Ergebnisse

1. Wirksamkeit des CKF und seiner durch Ultrafiltration gewonnenen Fraktionen III a und III b (Vorversuch)

SCHRÖPL (1966) führte eine Auftrennung der Ausgangssubstanz durch Ultrafiltration durch und stellte dabei fest, daß vermutlich zwei ekzematogene Substanzen existieren. Zu Beginn der vorliegenden Versuchsreihe zur weitergehenden Isolierung der wirksamen Komponenten wurden diese Versuche wiederholt. Die makroskopischen Bilder der Epicutantests mit den gewonnenen Fraktionen entsprachen den bekannten Reaktionsformen bei einfachen chemischen, ekzematogenen Substanzen. Auf histologische Untersuchungen wurde bei diesen orientierenden Untersuchungen verzichtet. Das Verhältnis der Häufigkeit der Reaktionen wird in Tab. 1 aufgeführt.

Reaktion auf CKF		Davon reagierten auf Fraktion -			
		IIIa	IIIb	beide	Keine Reaktion
positiv	120	15	49	38	18
negativ	30	o	o	o	30
gesamt	150	15	49	38	48

Tab. 1a) 48 Stunden-Reaktionen von 150 VP im Epicutantest auf CKF, die niedermolekulare (III a) und die hochmolekulare (III b) Fraktion

Reaktion auf CKF		Davon reagierten auf -	
		IIIa	IIIb
positiv	120	53 (44%)	87 (72,5%)
negativ	30	o	o
gesamt	150	53	87

Tab. 1b) Gesamtzahl der Reaktionen auf die niedermolekulare (IIIa) und die hochmolekulare (IIIb) Fraktion

Von den 150 VP, von denen 119 = 79 % klinisch Ekzematiker waren, reagierten 120 positiv auf das Ausgangsmaterial. Von diesen 120 zeigten wiederum 102 = 85 % ekzematöse Reaktionen auf eine der beiden bzw. beide Fraktionen, wobei das Verhältnis der Reaktionshäufigkeit von IIIa : IIIb = 53 (44 %) : 87 (72,5 %) betrug. Bei diesen Untersuchungen ergaben sich also häufiger positive Reaktionen auf die hochmolekulare Fraktion (IIIb).

In weiteren Voruntersuchungen wurde versucht, die wirksamen Komponenten in den Fraktionen III a und III b mittels Gel-filtration an Sephadexsäulen G 25 bis G 200 weiter anzureichern. Für die hochmolekulare Fraktion erwies sich die Methode als ungeeignet (hohe Viskosität, schlecht löslich). Der niedermolekulare Anteil ließ sich an den Sephadextypen G 75 und G 100 nicht fraktionieren, sondern ergab eine einheitliche Fraktion, die mit Äthanol gefällt, zentrifugiert und anschließend in 5 ml Wasser aufgenommen wurde. Diese Lösung wurde im Epicutantest auf ihre Wirksamkeit geprüft.

VP	CKF	UF	UF-75	UF-100
1	+(+)	(+)	-	-
2	+(+)	(+)	-	-
3	+	-	-	-
4	(+)	-	-	-
5	+(+)	-	-	-
6	+	(+)	-	-
7	+	-	-	-
8	++	+	+	+
9	(+)	-	-	-
10	++(+)	-	-	-
11	++	++	+	-
12	+	-	-	-
13	+	-	-	-
14	(+)	-	-	-
14	14	4	2	1

Tab. 2 48 Stunden-Reaktionen von 14 VP im Epicutantest auf CKF, die niedermolekulare Fraktion (IIIa) und deren Gelfiltrationsfraktionen UF 75 und UF 100

Von den 14 CKF-positiven VP reagierten 4 auf das Ultrafiltrat. Nur bei sehr starker Reaktion auf CKF und III a kam es gleichzeitig zu Reaktionen auf die Gelfiltrationsfraktionen.

Wegen der schlechten Ausbeute wurde die Ultrafiltrationsmethode nicht weiter verfolgt, sondern zunächst versucht, das nicht vorfraktionierte CKF mittels Gelfiltration direkt aufzutrennen.

2. Auftrennung des CKF durch Gelfiltration

Das Ausgangsmaterial CKF wurde zunächst zentrifugiert, weil sich beim längeren Stehen ein Niederschlag bildete (SCHRÖPL 1966).

Im Tierversuch (5 Meerschweinchen) wurden Intracutantests mit dem CKF-Sediment bzw. -überstand ausgeführt. Dabei kam es in keinem Fall zu Sofortreaktionen. Bei der 24- bzw. 48-Stunden-auswertung kam es auf das unverdünnte Sediment ausnahmslos, auf den Überstand in den meisten Fällen zu deutlicher Nekrosebildung. In einer Verdünnung auf 1 : 10 zeigten sich auf das Sediment noch teilweise Nekrosen, auf den Überstand geringfügige Veränderungen (Rötung und schwaches Ödem).

Der Überstand wurde auf das Zehnfache eingeeengt und jeweils 5 ml davon auf eine Sephadex G 200-Säule aufgebracht. Die drei nach ihrer UV-Absorption bei 256 nm unterscheidbaren Fraktionen wurden im Röhrchentest auf ihren Gehalt an amidoschwarz- bzw. mucicarminpositivem Material untersucht (Spot Test). Die Ergebnisse sind in Abb. 10 dargestellt. Daraus geht hervor, daß Fraktion I neben geringfügigen mucicarminpositiven Bestandteilen im wesentlichen aus hochmolekularem, proteinhaltigem Material bestand. Fraktion II war schwächer als Fraktion I bzw. III mit Amidoschwarz bzw. Mucicarmin färbbar. Die Fraktion III zeigte neben einer starken mucicarminpositiven Reaktion den typischen Geruch des Ausgangsmaterials und Spuren von amidoschwarz-positiven Substanzen.

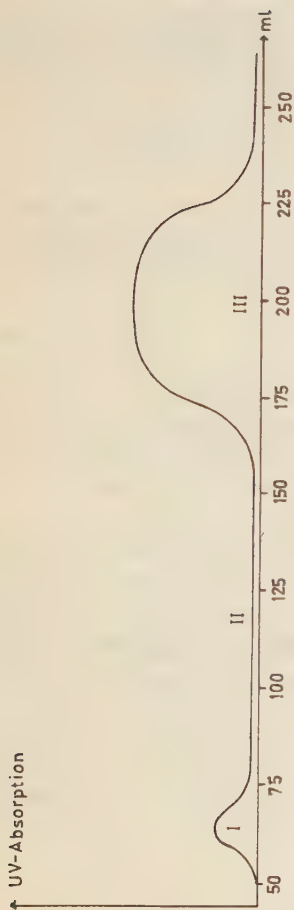


Abb. 10 a



Abb. 10 b

Abb. 10 a Auftrennung von CKF mittels Gelfiltration (Sephadex G 200). Eluatkurve mit Darstellung der UV-Absorption bei 256 nm

Abb. 10 b Darstellung der Amidoschwarz- bzw. Mucicarminfärbbarkeit der durch Gelfiltration von CKF gewonnenen Fraktionen (Spot Tests)

Die Wirksamkeit der drei Fraktionen wurde im Epicutantest an 41 VP geprüft. Die klinischen Bilder der Hautreaktionen entsprachen den Kriterien der ekzematösen Reaktion. In drei Fällen wurden Probeexcisate entnommen und histologisch untersucht. Die feingeweblichen Bilder waren mit denen von ekzematösen Reaktionen vereinbar. Das Ergebnis dieser Tests wird in Tab. 3 zusammengefaßt.

Reaktion auf CKF	Davon reagierten auf Fraktion -						alle keine	
	I	II	III	Iu.II	Iu.III	IIu.III	drei	Reakt.
positiv 37	o	o	8	o	o	15	9	5
negativ 4	o	o	o	o	o	2	o	2
gesamt 41	o	o	8	o	o	17	9	7

Tab. 3 a) 48 Stunden-Reaktionen von 41 VP im Epicutan-
test auf CKF und die durch Gelfiltration ge-
wonnenen Fraktionen I, II und III

Reaktion auf CKF	Davon reagierten auf -		
	I	II	III
positiv 37	9 = 24%	24 = 65%	32 = 86,5 %
negativ 4	o	2	2
gesamt 41	9	26	34

Tab. 3 b) Gesamtzahl der Reaktionen der Gelfiltrations-
produkte I, II und III

Von 41 VP reagierten 37 positiv auf die Ausgangssubstanz, davon insgesamt 32 = 86,5 % auf eine, zwei oder alle drei Fraktionen. Das Reaktionshäufigkeitsverhältnis der Fraktionen untereinander betrug 9 : 24 : 32. In zwei Fällen kam es bei offensichtlicher Wirkungslosigkeit der Ausgangssubstanz zu schwach positiven Testergebnissen auf die Fraktionen II und III. Da zwischen den Fraktionen II und III bezüglich ihrer Anfärbbarkeit mit Mucicarmin und ihrer Wirksamkeit im Epicutan-test kein deutlicher Unterschied bestand, wurden beide Substanzen bei den weiteren Tests vereinigt und die Fraktionen I und II+III in einer größeren Serie von Epicutan-tests gegenübergestellt.

Reaktion auf CKF	Davon reagierten auf Fraktion -					
	I	II+III	beide	keine R.	Σ I	Σ II+III
pos. 91	0	73	8	10	8 = 9%	81 = 89%
neg. 14	0	5	0	9	0	5
ges. 105	0	78	8	19	8	86

Tab. 4) 48 Stunden-Reaktionen von 105 VP im Epicutan-test auf CKF und die durch Gelfiltration (G 200) gewonnenen Fraktionen I bzw. II+III

Von 105 VP reagierten 91 positiv auf CKF, davon insgesamt 81 (89 %) auf eine bzw. beide Fraktionen. Auf Fraktion I alleine zeigten 8 (9 %), auf beide Fraktionen gemeinsam ebenfalls 8 (9%) und auf die Fraktion II+III 81 (89 %) ekzematöse Reaktionen. Bemerkenswert sind die positiven Testergebnisse auf II+III in fünf Fällen bei negativem Testausfall auf CKF.

Mit Hilfe dieser Technik konnte die gewünschte Reinigung des Polysaccharids nicht erreicht werden. Auch dieses Verfahren erschien daher als Vorfraktionierungsmethode nicht geeignet.

Es wurde deshalb nach relativ einfachen chemischen Methoden gesucht, um die Polysaccharid- bzw. TS-Komponente möglichst rein (vor allem eiweißfrei) darzustellen.

3. Polysaccharidisolierung mit Hilfe der Benzidinhydrochloridmethode

Die mit dem Polysaccharidpräparat PS-B durchgeführten Epicutantests entsprachen makroskopisch und histologisch (2 Excisate) ekzematösen Reaktionen. Einen Überblick über die Reaktionshäufigkeit gibt Tab. 5.

Reaktion auf CKF		Reaktion auf PS-B	
		pos.	neg.
positiv	47	26 = 55%	21
negativ	2	0	2
gesamt	49	26	23

Tab. 5) 48 Stunden-Reaktionen von 49 VP im Epicutantest mit dem durch die Benzidinhydrochloridmethode gewonnenen Polysaccharidpräparat PS-B.

Von 49 VP reagierten 47 auf das CKF positiv, davon 26 (55 %) in gleicher Weise auf das Polysaccharidpräparat PS-B.

Die elektrophoretische Untersuchung des Materials ergab, daß es noch relativ viel amidoschwarzpositive Anteile enthielt. Dieses Verfahren erschien daher ebenfalls nicht zur Isolierung der Polysaccharidkomponente geeignet.

4. Polysaccharidisolierung mit Hilfe der Chloroform-Butanolmethode (SEVAG)

Mit dieser Methode wurde eine weitgehende Reinigung des Polysaccharidanteils von CKF erzielt, wie durch anschließende Hydrolyseuntersuchungen gezeigt werden konnte. Das resultierende Präparat PS-C wurde auf seine ekzematogene Wirksamkeit an 82 VP getestet. Die klinischen und feingeweblichen (1 Excisat) Bilder waren mit ekzematösen Reaktionen vereinbar. Die zahlenmäßige Auswertung der Testergebnisse wird in Tab. 6 widergegeben.

Reaktionen auf CKF		Reaktion auf PS-C	
		pos.	neg.
positiv	69	57 = 83%	12
negativ	13	5	8
gesamt	82	62	20

Tab. 6) 48 Stunden-Reaktionen von 82 VP im Epicutantest mit dem durch Enteiweißung mit Chloroform-Butanol gewonnenen Polysaccharidpräparat PS-C

Von 82 getesteten VP reagierten 69 auf die Ausgangssubstanz und davon wiederum 57 (83 %) auf das Polysaccharidpräparat PS-C. Wiederum kam es in fünf Fällen, in denen keine Reaktion auf das CKF festgestellt werden konnte, zu deutlichen ekzematösen Veränderungen im PS-C-Testareal. Ausserdem wurde in einer beträchtlichen Anzahl von Fällen auf die Polysaccharidfraktion eine stärkere oder gleich starke Reaktion im Vergleich zum CKF festgestellt. Die Untersuchung der Spaltprodukte nach hydrolytischer Auftrennung des Materials ergab die Komponenten Glycin, Alanin, Lysin, Glutaminsäure, Glucosa-

min, Ribitol, Anhydroribitol und Glucosaminylribitolphosphat. Es fanden sich also nur noch die Bestandteile des Glycosaminopeptid-TS-Komplexes.

Vergleichende Untersuchungen der Wirksamkeit im Epicutantest zwischen Fraktion II+III und PS-C wurden an 75 Patienten durchgeführt. Die zahlenmäßige Auswertung ergibt sich aus Tab. 7.

Reaktion auf CKF	Davon reagierten auf Fraktion -							keine Reakt.
	I	II+III	PS-C	I u. II+III	I u. PS-C	II+III u. PS-C	alle drei	
pos. 63	o	6	6	o	o	45	3	3
neg. 12	o	o	1	o	o	4	o	7
ges. 75	o	6	7	o	o	49	3	10

Tab. 7a) 48 Stunden-Reaktionen von 75 VP im Epicutantest auf CKF und die Fraktionen I, II+III (Gelfiltration) und PS-C (Chloroform-Butanol-Methode)

Reaktion auf CKF	Davon reagierten auf Fraktion -		
	I	II+III	PS-C
positiv 63	3	54	54
negativ 12	o	4	5
insgesamt 75	3	58	59

Tab. 7b) Gesamtzahl der 48 Stunden-Reaktionen auf die Fraktionen I, II+III und PS-C

Von 75 VP reagierten 63 positiv auf das Ausgangsmaterial. Von diesen zeigten 48 (76 %) ekzematöse Veränderungen gleichzeitig auf PS-C u n d II+III und in jeweils 6 (10 %) nur

auf eine der beiden Fraktionen. Auch hier fanden sich in einzelnen Fällen positive Testreaktionen auf die Fraktionen bei negativen Werten für die Ausgangssubstanz. Die Übereinstimmung der Reaktionshäufigkeit der beiden Substanzen II+III und PS-C legte den Schluß nahe, daß die zunächst durch die Gelfiltration nur grob gereinigte wirksame Komponente vollständig in der weitgehend eiweißfreien Fraktion PS-C, die nur noch die Mucopeptidkomponente enthielt, vorlag.

5. Polysaccharid- bzw. Teichinsäureisolierung mit Hilfe der Phenylhydrazin- bzw. Trichloressigsäureextraktion

Mit Hilfe dieser Methoden wurden Versuche zur TS-Isolierung ausgeführt. Die Aktivität des durch Phenylhydrazinextraktion aus CKF gewonnenen Materials erwies sich im Epicutantest als zu gering. Außerdem war die erzielte Eiweißabtrennung, wie elektrophoretische Kontrollen zeigten, unzureichend. Die Trichloressigsäureextraktion führte bisher ebenfalls noch nicht zu befriedigenden Resultaten. Hier sind weitere Untersuchungen erforderlich.

6. Untersuchungen des CKF und der verschiedenen Polysaccharidpräparate auf Präcipitine

a) Agargeldiffusionstest

Die vor Beginn der Immunisierung entnommenen Kontrollsera bildeten keine Präcipitationslinien gegen das Ausgangsmaterial CKF aus. Bei der Untersuchung des CKF auf Präcipitine kam es bis zu einer Verdünnung von 1 : 16 zur Ausbildung von Präcipitationsdoppellinien. Vergleichende Untersuchungen mit den Polysaccharidfraktionen PS-B und PS-C zeigten jeweils eine einfache, scharfe Linie bis zu Titern von 1 : 8 bzw. 1 : 16, die mit der serumnahen CKF-Linie korrespondierte. Die einfache Präcipitationslinie der Fraktion II+III stand offensichtlich in Beziehung zu den vorhergehenden, während sich für die Fraktion I eine in die antigennahe Linie des CKF übergehende Einzellinie ausbildete.

b) Immunoelektrophorese

Die vergleichende Untersuchung von CKF und PS-C ergab, daß das CKF zwei anodisch wandernde Präcipitine enthielt, während das Präparat PS-C nur die Linie aufwies, die dem schneller anodisch wandernden Präcipitin des CKF entsprach.

D. DISKUSSION

Ausgehend von der von SCHRÖPL (1966) ausgesprochenen Vermutung, daß es sich bei der von ihm gereinigten niedermolekularen, ekzematogenen Substanz von *St. aureus* um die Mucopolysaccharid- bzw. Teichinsäure-Komponente handle, wurde in den vorliegenden Untersuchungen nach weiteren geeigneten Methoden gesucht, aus dem Cellophankulturfiltrat dieser Keime unter ständiger Kontrolle der klinischen Wirksamkeit, d.h. der ekzematogenen Aktivität, diese Komponenten zu isolieren.

In der vorliegenden Arbeit wurde zunächst nochmals - von der Fraktionierung durch Ultrafiltration ausgehend - versucht, eine Trennung der nieder- und hochmolekularen Fraktionen zu erzielen. Bei der Auswertung der Testergebnisse mit den Ultrafiltrationsfraktionen III a (Ultrafiltrat) und III b (nicht ultrafiltrables Material) stellte sich heraus, daß - im Gegensatz zu den Ergebnissen von SCHRÖPL - die hochmolekulare Fraktion III b häufiger reagierte. Der Grund hierfür dürfte in erster Linie in einer Qualitätsveränderung der benutzten Ultrafilter zu suchen sein (s. weiter unten!).

Die in Tab. 2 aufgeführten, zahlenmäßig geringen positiven Reaktionen auf die Gelfiltrationsprodukte des Ultrafiltrates (UF 75 und UF 100) ließen vermuten, daß infolge eines Verdünnungseffektes durch die Ultrafiltration die anzunehmende Konzentrationsschwelle der im Ultrafiltrat enthaltenen Aktivität nach weiterer Fraktionierung an den Sephadex-Geltypen G 75 und G 100 unterschritten war. Eine weitere Einengung des Materials war dabei nicht sinnvoll, weil die Relation zur Konzentration des Ausgangsmaterials erhalten bleiben mußte, um vergleichbare Werte zu bekommen. Weitere Reinigungsversuche

auf der Basis der Ultrafiltration wurden aus den erwähnten Gründen nicht durchgeführt. Statt dessen wurde zunächst versucht, aus dem Ausgangsmaterial nach Zentrifugierung (zur Abtrennung des Bodensatzes) den Eiweißanteil mittels Gel-filtration abzutrennen.

Im Tierversuch (Intracutantests an Meerschweinchen) war in Übereinstimmung mit SCHRÖPL (1966) vorher gezeigt worden, daß die Masse des nekrotoxischen Materials im Sediment des CKF enthalten war. Bei Intracutantests mit dem Überstand zeigten sich keine Sofortreaktionen; zur Nekrosebildung kam es nur mit dem unverdünnten Material.

Die Auftrennung des CKF durch Gelfiltration ergab drei Fraktionen, deren Eigenschaft mit -

- I - hochmolekular, eiweißreich, polysaccharidarm,
- II - von mittlerer Molekülgröße, mäßigem Gehalt an Eiweiß und Polysaccharid und
- III - niedermolekular, eiweißarm, polysaccharidreich bezeichnet werden konnten. Das Reaktionsverhältnis der Fraktionen I : II : III = 9 : 24 : 32 stimmte gut mit dem nach der Mucicarminfärbbarkeit geschätzten Polysaccharidgehalt überein. Dabei reagierten auf die polysaccharidreiche Fraktion III insgesamt 86,5 % der CKF-positiven Probanden. Aus den oben dargelegten Gründen wurden die Fraktionen II und III in den weiteren Versuchen vereinigt, und damit anschließend mit zwei deutlicher zu unterscheidenden Fraktionen weitergetestet. Zu positiven Reaktionen auf die Fraktion I kam es nur bei 9 % und zwar nur bei gleichzeitiger Reaktion auf die Fraktion II+III. Nahezu 90 % der CKF-positiven VP reagierten gleichzeitig auf die Fraktion II+III. Daraus konnte der Schluß gezogen werden, daß die Masse des wirksamen Materials in der niedermolekularen, polysaccharidreichen Fraktion enthalten war,

was die von den eigenen differierenden Ergebnisse SCHRÖPLs für die Epicutantests mit den Ultrafiltrationsprodukten bestätigt. Anscheinend passierte die zum überwiegenden Teil niedermolekulare, ekzematogene Substanz die benutzten Ultrafilter in wechselndem Ausmaß. In einzelnen Fällen kam es bei negativer Reaktion auf die Ausgangssubstanz zu ekzematösen Veränderungen auf die durch die verschiedenen Methoden gewonnenen Fraktionen. Außerdem waren die zugehörigen Reaktionen häufig stärker ausgeprägt als auf das CKF. Für diese Beobachtung kann vorerst noch keine sichere Deutung gegeben werden. Wie aus der Beschreibung der Versuchsanordnung und der Ergebnisse ersichtlich wird, wurde durch die Gelfiltration nur eine grobe Abtrennung der Masse des Eiweißmaterials erreicht. In den folgenden Versuchen wurde deshalb nach Methoden zur weiteren Isolierung der Polysaccharidkomponente gesucht. Bei den Testungen, die mit dem durch Eiweißfällung mittels Benzidinhydrochlorid gewonnenen Polysaccharidpräparat PS-B angestellt wurden, war die aus der Häufigkeit der Reaktionen (55 % der CKF-positiven VP) abgelesene Aktivität bedeutend geringer als bei den anderen Präparaten. Außerdem wurde nur eine unzureichende Eiweißabtrennung erzielt, wie elektrophoretische Untersuchungen zeigten.

Bedeutend günstigere Ergebnisse wurden nach Eiweißfällung mit Hilfe der modifizierten SEVAGschen Chloroform-Butanol-Methode erzielt: Fast 83 % der VP, die auf die Ausgangssubstanz reagiert hatten, zeigten ekzematöse Reaktionen auch auf das resultierende Polysaccharidpräparat PS-C. Hydrolyseuntersuchungen ergaben, daß in diesem Material nur noch die Bestandteile des Glycosaminopeptid-Teichinsäure-Komplexes vorhanden waren. Bestätigt wurden diese Angaben durch die

Untersuchungen des UV-Spektrums. Es fanden sich keine Maxima zwischen 240 - 280 nm; die Kurve glich der von HAUKENES (1962) für das Polysaccharid A beschriebenen. Auf Grund der Untersuchungsergebnisse mit dem PS-C konnte die Vermutung SCHRÖPLS (1966) bestätigt werden, daß das chemische Substrat für mindestens einen Teil der ekzematogenen Substanzen in dem Teichinsäure-Glycosaminopeptid zu suchen ist.

Die Untersuchungen der als ekzematogen wirksam anzusehenden Substanzen auf Präcipitine mit Hilfe des Agargelddiffusionstestes ergaben zwei Präcipitationslinien für die Ausgangssubstanz CKF. Beim Vergleich dieser Linien mit den bei OEDING und HAUKENES (1963) zusammengestellten bekannten Antigenlinien von kompletten oder zerriebenen Staphylokokken gegen Staphylokokkenantisera stimmte die serumnahe, kräftige Linie mit der Polysaccharidlinie überein. Für die Zugehörigkeit der antigennahen Präcipitationslinie kommen das in vielen Staphylokokkenstämmen vorkommende n-Antigen, das Proteincharakter besitzt (HAUKENES und OEDING 1960), mit geringer Wahrscheinlichkeit einige nur in einzelnen Stämmen vorkommende Antigene (z.B. h, i) und vor allem das gruppenspezifische Antigen A (JENSEN, 1958, 1959) in Frage, das nach neueren Untersuchungen (LÖFKVIST und SJÖQUIST 1964) ebenfalls Proteincharakter besitzt. Die Fraktionen II+III, PS-B und PS-C bildeten jeweils eine Einzellinie aus, die mit der Polysaccharidlinie korrespondierte.

Das Ergebnis der immunoelektrophoretischen Untersuchungen, daß für das Präparat PS-C nur die Präcipitationslinie vorhanden war, die dem schneller anodisch wandernden Präcipitin des CKF entsprach, unterstreicht ebenfalls den Polysaccharidcharakter der Substanz.

Nachdem die Rolle des Polysaccharids A oder Teichinsäure-Glycosaminopeptids als ekzemauslösende Substanz somit als gesichert angesehen werden kann, erhebt sich die Frage, ob die Teichinsäure als dessen wichtigster Bestandteil für sich alleine in der Lage ist, ekzematöse Veränderungen hervorzurufen. Weitere Versuche zur Aufteilung des Polysaccharids in seine beiden Polymerketten und deren getrennte Untersuchung im Epicutantest sind bereits im Gange. Außerdem besteht weiterhin die Frage nach der Natur des auch in dieser Arbeit in Erscheinung tretenden hochmolekularen ekzematogenen Stoffes.

E. ZUSAMMENFASSUNG

Einleitend wird die Bedeutung von in *Staphylococcus aureus* enthaltenen Substanzen für die Auslösung des mikrobiellen Ekzems kurz umrissen. Dabei wird zunächst ein Überblick über die Arbeiten, die sich mit diesen Stoffen beschäftigen, gegeben und zusammenfassend über ihre bisher bekannten Eigenschaften berichtet. Nach SCHRÖPL (1966) soll zumindest ein Teil der ekzemauslösenden Stoffe in dem von HAUKENES (1962) näher charakterisierten Polysaccharid A von JULIANELLE und WIEGHARD zu suchen sein, und zwar soll es sich dabei eventuell um die Teichinsäure aus den Zellwänden dieser Keime handeln. In den vorliegenden Untersuchungen wurde versucht, das ekzematogene Material weiter zu reinigen und zu charakterisieren. Da die fraglichen Substanzen in der Zellwand der Mikroorganismen zu suchen waren, wurde zuvor eine Sichtung der bekannten Komponenten der Zellwand von *Staphylococcus aureus* vorgenommen. Im wesentlichen kamen danach nur die Bestandteile des Glycosaminopeptid- (Mucopeptid-) Teichinsäurekomplexes in Frage. Nach HAUKENES (1962) entspricht dieser dem Polysaccharid A, auf welches in einem weiteren Abschnitt eingegangen wird. Ausführlich wird die Literatur über die Teichinsäuren der verschiedensten Mikroorganismen und besonders von *Staphylococcus aureus* besprochen.

Im experimentellen Teil der Arbeit wurde zunächst in Vorversuchen nochmals von der von SCHRÖPL (1966) angewandten Ultrafiltration des als Ausgangssubstanz verwendeten Cellophan-kulturfiltrates ausgegangen. Anschließend wurde versucht, eine erste Auftrennung des Ausgangsmaterials direkt durch Gelfiltration zu erreichen.

Die Testergebnisse mit den zwei bzw. drei resultierenden Fraktionen nach Gelfiltration zeigten ein deutliches Übergewicht der ekzematogenen Wirksamkeit der niedermolekularen, polysaccharidreichen und proteinarmen Fraktionen III bzw. II+III gegenüber der proteinreichen Fraktion I, was in Einklang mit den Ultrafiltrationsergebnissen von SCHRÖPL (1966) steht. Weiterhin wurde eine Reinigung des Polysaccharids durch verschiedene Fällungs- bzw. Extraktionsmethoden versucht. Mit Hilfe der Eiweißfällungsmethode mit Benzidinhydrochlorid wurde ein Polysaccharidpräparat gewonnen, auf das 55 % der Versuchspersonen, die auf die Ausgangssubstanz positiv reagierten, deutliche ekzematöse Veränderungen zeigten. Das Präparat enthielt noch beträchtliche Mengen von proteinhaltigem Material. Eine bessere Reinigung wurde dagegen durch Eiweißfällung mit Hilfe von Chloroform-Butanol erzielt. Auf das resultierende Polysaccharidpräparat reagierten im Epicutantest von den Versuchspersonen, die ekzematöse Veränderungen auf das Cellophankulturfiltrat zeigten, 83 % positiv. Untersuchungen der Hydrolyseprodukte dieses Präparates ergaben, daß nur noch die Komponenten des Teichinsäure-Glycosaminopeptids vorhanden waren. Vergleichende Untersuchungen zwischen diesem Polysaccharidpräparat und der polysaccharidreichen Gelfiltrationsfraktion II+III ergaben annähernde Übereinstimmung der Häufigkeit der Reaktionen. Versuche zur direkten Isolierung der Teichinsäure durch Phenylhydrazin- bzw. Trichloressigsäureextraktion führten noch nicht zu den gewünschten Ergebnissen und sollen weiter verfolgt werden. Immunologische Untersuchungen ergaben im Agargeldiffusionstest zwischen dem Cellophankulturfiltrat und dem Staphylokokkenantiserum von Kaninchen zwei

Präcipitationslinien. Die serumnahe (Polysaccharid-) Linie korrespondierte mit den untereinander offensichtlich identischen Einzellinien der verschiedenen Polysaccharidpräparate. Die immunoelektrophoretische Untersuchung führte zu entsprechenden Ergebnissen.

Aus diesen Untersuchungen wird die Vermutung bestätigt, daß die Polysaccharidkomponente oder Teile derselben eine entscheidende Bedeutung für die ekzematogene Aktivität von *Staphylococcus aureus* besitzen. In weiteren Versuchen sollen die Hauptkomponenten des Polysaccharids, die Teichinsäure und das Glycosaminopeptid, getrennt voneinander auf ihre ekzematogene Wirksamkeit geprüft werden.

Herrn Professor Dr.med. H. Röckl danke ich für die Übernahme des Korreferates und die Gewährung der Arbeitsmöglichkeit in seiner Klinik.

Herrn Privatdozent Dr.med. F. Schröpl gilt mein Dank für die Überlassung des Themas, die Heranführung an das Stoffgebiet und die ständige Förderung der Durchführung der Arbeit.

Herrn Diplomchemiker Dr.rer.nat. G. Peter, Leiter der biochemischen Abteilung der Dermatologischen Klinik, bin ich für seine wertvollen Ratschläge und seine Unterstützung bei der Durchführung des chemischen Teiles der Arbeit zu Dank verpflichtet.

F. LITERATURVERZEICHNIS

- Abdulla, E.M. and J.H. Schwab: Immunological properties of bacterial cell wall mucopeptides
Proc.Soc.Exp. Biol.Med. 118, 359 (1965)
- Archibald, A.R., J.J. Armstrong, J. Baddiley and J.B. Hay: Teichoic acids and the structure of bacterial walls
Nature (London) 191, 570 (1961)
- Archibald, A.R. and J. Baddiley: The extraction of teichoic acid from bacterial walls with phenylhydrazine, and its significance for the nature of their linkage with glycosaminopeptides
Biochem.J. 95, 19c (1965)
- Archibald, A.R., J. Baddiley and J.G. Buchanan: The ribitol teichoic acid from lactobacillus arabinosus walls
Isolation and structure of ribitol glycosides
Biochem.J. 81, 124 (1961)
- Archibald, A.R., J. Baddiley and D. Button: A new kind of teichoic acid from the cell walls of a strain of Staphylococcus lactis
Biochem.J. 95, 8c (1965)
- Armstrong, J.J., J. Baddiley and J.G. Buchanan: Structure of the ribitol teichoic acid from the walls of Bacillus subtilis
Biochem. J. 76, 610 (1960) bzw.
Nature (London) 184, 248 (1959)
- Armstrong, J.J., J. Baddiley and J.G. Buchanan: Further studies on the teichoic acid from bacillus subtilis walls
Biochem. J. 80, 254 (1961)

- Armstrong, J.J.,
J. Baddiley,
J.G. Buchanan and
B. Carss: Nucleotides and the bacterial cell wall
Nature (London) 181, 1692 (1958)
- Armstrong, J.J.,
J. Baddiley,
J.G. Buchanan,
B. Carss and
G.R. Greenberg: Isolation and structure of ribitol
phosphate derivates (teichoic acids)
from bacterial cell walls
J.Chem.Soc. 4344 (1958)
- Armstrong, J.J.,
J. Baddiley,
J.G. Buchanan,
A.L. Davison,
M.V. Kelemen and
F.C. Neuhaus: Composition of teichoic acids from a
number of bacterial walls
Nature (London) 184, 247 (1959)
- Baddiley, J.: Nucleotides and bacterial cell wall
components
Proc. Chem.Soc. 177 (1959)
- Baddiley, J.: Mitteilung zitiert aus "Immunochemical
Approaches to Problems in Microbiology",
Eds. M. Heidelberger, O.J. Plescia and
R.A. Day, Rutgers University Press,
N.Y., 91 (1961)
- Baddiley, J.: Teichoic acids in walls and cells of
Gram-positive bacteria
Fed.Proc. 21, 1084 (1962a)
- Baddiley, J.: Structure and properties of teichoic
acids
Biochem.J. 82, 36P (1962b)
- Baddiley, J.,
J.G. Buchanan and
B. Carss: Configuration of the ribitol phosphate
residue in cytidine diphosphate ribitol
J.Chem.Soc. 1869 (1957a)

- Baddiley, J.,
J.G. Buchanan and
B. Carss: Hydrolysis of ribitol 1(5)-phosphate,
riboflavine, 5'-phosphate, and related
compounds
J.Chem.Soc. 4058 (1957b)
- Baddiley, J., The presence of ribitol phosphate in
J.G. Buchanan and bacterial cell walls
B. Carss: Biochim.Biophys.Acta 27, 220 (1958)
- Baddiley, J., Cytidine diphosphate ribitol from
J.G. Buchanan, Lactobacillus arabinosus
B. Carss and Biochim.Biophys. Acta 21, 191 (1956)
A.P. Mathias:
- Baddiley, J., Isolation of cytidine diphosphate glyce-
J.G. Buchanan, rol, cytidine diphosphate ribitol, and
B. Carss, mannitol-1-phosphate from Lactobacillus
A.P. Mathias and arabinosus
A.R. Sanderson: Biochem.J. 64, 599 (1956)
- Baddiley, J., Synthesis of CDP-ribitol
J.G. Buchanan and J.Chem.Soc. 2192 (1959)
C.P. Fawcett:
- Baddiley, J., Synthesis of 4-O-(β -D-glucopyranosyl)-
J.G. Buchanan and D-ribitol, a degradation product of the
F.E. Hardy: ribitol teichoic acid from the walls of
Bacillus subtilis
J.Chem.Soc. 2180 (1961)
- Baddiley, J., The structure of the ribitol teichoic
J.G. Buchanan, acid of Staphylococcus aureus H
F.E. Hardy, Biochim. Biophys. Acta 52, 406 (1961)
R.O. Martin,
U.L.Raj Bhandary and
A.R. Sanderson:

- Baddiley, J.,
J.G. Buchanan,
R.O. Martin and
U.L. Raj Bhandary: Teichoic acid from the walls of Staphylococcus aureus H. 2. Location of phosphate and alanine residues
Biochem. J. 85, 49 (1962)
- Baddiley, J.,
J.G. Buchanan,
U.L. Raj Bhandary and
A.R. Sanderson: Teichoic acid from the walls of Staphylococcus aureus H. Structure of the N-acetylglucosaminyldribitol residues
Biochem.J. 82, 439 (1962)
- Baddiley, J.,
J.G. Buchanan and
A.R. Sanderson: Synthesis of CDP-Glycerol
J.Chem.Soc. 3107 (1958)
- Baddiley, J. and
A.L. Davison: The occurrence and location of teichoic acids in Lactobacilli
J.Gen.Microbiol. 24, 295 (1961)
- Baddiley, J. and
A.P. Mathias: Cytidine-5'-phosphate and its derivatives in Lactobacillus arabinosus
J.Chem.Soc. 2723 (1954)
- Baillie, R.D. and
W.H. Holms: Function of teichoic acid
Proc.Biochem.Soc. 99, 28P (1966)
- Beiser, S.M.,
M. Dworetzky,
K.M. Smart and
H.S. Baldwin: Studies of materials derived from Staphylococcus. IV. Precipitating antibodies to staphylococcal antigens in human sera
J. Allergy 29, 44 (1958)
- Burger, M.M. and
L. Glaser: The synthesis of teichoic acids. I. Polyglycero phosphate
J. Biol.Chem. 239, 3168 (1964)

- Button, D.,
A.R. Archibald and
J. Baddiley:
The linkage between teichoic acid and
glycosaminopeptide in the walls of a
strain of *Staphylococcus lactis*
Biochem.J. 99, 11c (1966)
- Clotten, R. und
A. Clotten:
Unveröffentlichte Versuche zitiert aus
"Hochspannungselektrophorese"
Thieme, Stuttgart, (1962)
- Cohen, J.O.,
G.S. Cowart and
W.B. Cherry:
Antibodies against *Staphylococcus aureus*
in nonimmunized rabbits
J. Bact. 82, 110 (1961)
- Critchley, P.,
A.R. Archibald and
J. Baddiley:
The intracellular teichoic acid from
Lactobacillus arabinosus 17-5
Biochem. J. 85, 420 (1962)
- Davison, A.L. and
J. Baddiley:
The distribution of teichoic acids in
staphylococci
J.Gen.Microbiol 32, 271 (1963)
- Davison, A.L. and
J. Baddiley:
Glycerol teichoic acids in walls of
Staphylococcus epidermidis
Nature (London) 202, 874 (1964)
- Davison, A.L.,
J. Baddiley,
T. Hofstad,
N. Losnegard and
P. Oeding:
Serological investigations on teichoic
acids from the walls of staphylococci
Nature (London) 202, 872 (1964)
- Elliott, S.D.:
Teichoic acid and the group antigen
of group D streptococci
Nature (London) 193, 1105 (1962)

- Ellwood, D.C.,
M.V. Kelemen and
J. Baddiley: The glycerol teichoic acid from the
walls of *Staphylococcus albus* NCTC 7944
Biochem. J. 86, 213 (1963)
- Few, A.V.: The interaction of polymyxin E with
bacterial and other lipids
Biochim. Biophys. Acta 16, 137 (1955)
- Gahlen, W.: Die Pathergie des mikrobiellen Ekzems
Zschr. f.H. und G. 9/XLI 347 (1966)
- Ghuysen, J.M.: Teichoic acid-mucopeptid complex from
Bacillus megaterium KM cell walls
Biochim. Biophys. Acta 50, 413 (1961)
- Ghuysen, J.M.: Alkaline degradation of the phospho-
mucopolysaccharide from cell walls of
Bacillus megaterium KM
Biochim. Biophys. Acta. 83, 132 (1964)
- Ghuysen, J.M.,
L. Dierickx,
M. Leyh-Bouille,
J.L. Strominger,
E. Bricas and
C. Nicot: Structure of the cell wall of *Staphylo-*
coccus aureus strain Copenhagen
V. Isolation of peptidases active on the
peptide moiety of the cell walls of some
Gram-positive bacteria
Biochem. (Wash.) 4, 2237 (1965)
- Ghuysen, J.M. and
J.L. Strominger: Structure of the cell wall of *Staphylo-*
coccus aureus strain Copenhagen.
I. Preparation of fragments by enzymatic
hydrolysis
Biochem. (Wash.) 2, 1110 (1963)

- Ghuysen, J.M.,
D.J. Tipper,
C.H. Birge et al.: Structure of the cell wall of Staphylo-
coccus aureus, strain Copenhagen.
VI. The soluble glycopeptide and its
sequential degradation by peptidases
Biochem.(Wash.) 4, 2245 (1965)
- Ghuysen, J.M.,
D.J. Tipper and
J.L. Strominger: Structure of the cell wall of Staphylo-
coccus aureus, strain Copenhagen
IV. The teichoic acid-glycopeptide
complex
Biochem.(Wash.) 4, 474 (1965)
- Glaser, L.: The synthesis of teichoic acids.
II. Polyribitol phosphate
J.Biol.Chem. 239, 3178 (1964)
- Glaser, L.: The synthesis of teichoic acids.
IV. On the regulation of the cytidine-
5-diphosphateglycerol concentration
Biochim.Biophys. Acta 101, 6 (1965)
- Grabar, P. et
C.A. Williams: Méthode permettant l'étude conjuguée des
propriétés électrophorétiques et immuno-
chimiques d'un mélange de protéines.
Application au sérum sanguin
Biochim.Biophys. Acta 10, 193 (1953)
- Grabar, P. et
C.A. Williams: Méthode immuno-électrophorétique
d'analyse de mélanges de substances
antigéniques
Biochim.Biophys. Acta 17, 67 (1955)
- Hais, J.M. und
K. Macek: Handbuch der Papierchromatographie
G. Fischer, Jena (1958)

- Haukenes, G.: Immunochemical studies on polysaccharide A of *Staphylococcus aureus*. I-VII
Acta path. et microbiol.scand. 55, 110 (1962)
- Haukenes, G.,
D.C. Ellwood,
J. Baddiley and
P. Oeding: Serological cross-reactivity between polysaccharide A and teichoic acid of *Staphylococcus aureus*
Biochim. Biophys. Acta 53, 425 (1961)
- Haukenes, G.,
N. Losnegard and
P. Oeding: Extraction of antigenic material from *Staphylococcus aureus*
Act.path. et microbiol.scand. 53, 84 (1961)
- Haukenes, G. and
P. Oeding: On two new antigens in *Staphylococcus aureus*
Act.path.et microbiol. scand. 49, 237 (1960)
- Hay, J.B.,
A.R. Archibald and
J. Baddiley: The molecular structure of bacterial walls. The size of ribitol teichoic acids and the nature of their linkage to glycosaminopeptides
Biochem. J. 97, 723 (1965)
- Hay, J.B.,
N.B. Davey,
A.R. Archibald and
J. Baddiley: The chain length of ribitol teichoic acids and the nature of their association with bacterial cell walls
Biochem. J. 94, 7c (1965)
- Hay, J.B.,
A.J. Wicken and
J. Baddiley: The location of intracellular teichoic acids.
Biochim. Biophys. Acta 71, 188 (1963)
- Hofstad, T.: Studies on the antigenic structure of the 80/81 complex of *Staphylococcus aureus*
Act.path.microbiol.scand. 61, 558 (1964)

- Hisatsune, K.,
S.J. Decourey jr. and
S. Mudd: An immunologically active cell-wall
peptide polymer obtained from the
culture filtrates of *Staphylococcus*
aureus
Biochim. Biophys. Act. 121, 210 (1966)
- Ikawa, M.: The partial chemical degradation of
the cell walls of *Lactobacillus plan-*
tarum, *Streptococcus faecalis*, and
Lactobacillus casei: *J. Biol.Chem.*
236, 1087 (1961)
- Ishimoto, N. and
J.L. Strominger: Polyribitol phosphate synthetase of
Staphylococcus aureus
J. Biol.Chem. 241, 639 (1966)
- Jeanloz, R.W.: Zitiert nach Salton, M.R.
"The bacterial cell wall"
Elsevier Publishing Company (Amster-
dam, London, N.Y.) 129 (1954)
- Jensen, K.: A normally occurring staphylococcus
antibody in human serum
Act.path. et micribiol. scand. 44, 421
(1958)
- Jensen, K.: Investigations on the antigenic structu-
re of staphylococci with special re-
gard to a polysaccharide antigen and
normally occurring antibodies against
this
Summary of Dissertation, Ejnar Munks-
gaard, Kopenhagen (1959)
- Juergens, W.G.,
A.R. Sanderson and
J.L. Strominger: Chemical basis for the immunological
specificity of a strain of *Staphylo-*
coccus aureus
Bull.Soc.Chim.Biol. 42,1669 (1960) bzw.
J.Exp. Med. 117, 925 (1963)

- Julianelle, L.A. and A.F. Hartmann: The immunological specificity of Staphylococci. IV. Cutaneous reactions to the typespecific carbohydrates
J.Exp. Med. 64, 149 (1936)
- Julianelle, L.A. and C.M. Wieghard: Immunological specificity of carbohydrates derived from Staphylococci
Proc.Soc.Exp. Biol.and Med.31, 947 (1934)
- Kahn, M.C., H.S. Baldwin, B.R. Zeitlin and K.M. Smart: Cutaneous reactions to staphylococcus polysaccharide, protein, and an unfractionated extract in hypersensitive and normal individuals
J. Allerg. 22, 237 (1951)
- Kelemen, M.V. and J. Baddiley: Structure of the intracellular glycerol teichoic acid from Lactobacillus casei ATCC 7469
Biochem.J. 80, 246 (1961)
- Kent, L.H.: The structure of muramic acid
Biochem. J. 67, 5P (1957)
- Lilly, M.D.: Cell-wall precursors in Escherichia coli 26-26
J.Gen.Microbiol. 28, ii-iii (1962)
- Löfkvist, T. and J. Sjöquist: Immunochemical analysis of staphylococcal antigenic preparations
Int.Arch.Allerg. 24, 244 (1964)
- Mandelstam, J. and H.J. Rogers: The incorporation of amino acids into the cell-wall mucopeptide of staphylococci and the effect of antibiotics on the process
Biochem. J. 72, 654 (1959)

- Mandelstam, M.H. and J.L. Strominger: On the structure of the cell wall of *Staphylococcus aureus*
Biochem. Biophys. Res. Comm. 5, 466 (1961)
- Martin, R.R., H. Daugharty and A. White: Staphylococcal antibodies and hypersensitivity to teichoic acids in man
Antimicrob. Agents Chemother. 5, 91 (1965)
- Mc. Carty, M.: Variation in the group-specific carbohydrate of group A streptococci.
II. Studies on the chemical basis for serological specificity of the carbohydrates
J. Exp. Med. 104, 629 (1956)
- Mc. Carty, M.: Further studies on the chemical basis for serological specificity of group A streptococcal carbohydrate
J. Exp. Med. 108, 311 (1958)
- Mc. Carty, M.: The occurrence of polyglycerophosphate as an antigenic component of various Gram-positive bacterial species
J. Exp. Med. 109, 361 (1959)
- Mc. Carty, M.: The role of D-Alanine in the serological specificity of group A streptococcal glycerol teichoic acid
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 52, 259 (1964)
- Meyer-Rohn, J. und B. Rohde: Zur Natur der ekzematogenen Substanzen beim mikrobiellen Ekzem
Acta allerg. 13, 389 (1959)
- Meyer-Rohn, J. und G. Schröder: Die Bedeutung von Bakterienstoffwechselprodukten für die Ekzemenese
Arch. Derm. Syph. (Berlin) 196, 305 (1953)

- Miescher, G.,
H. Lincke und
H. Storck:
Analytische Untersuchungen epikutan wirk-
samer Stoffe der Staphylokokken
Bull.Schweiz.Akad.Med.Wiss. 4, 355 (1948)
- Mitchel, P. and
J. Moyle:
The glycerophospho-protein complex envelope
of Micrococcus pyogenes
J.Gen.Microbiol. 5, 981 (1951)
- Morse, S.J.:
Studies on the chemistry and immuno-
chemistry of cell walls of Staphylococcus
aureus
J.Exp.Med. 116, 229 (1962)
- Mudd, S.,
A. Yoshida,
I.W.Li and
N.A. Lenhart:
Identification of a somatic antigen of
Staphylococcus aureus critical for phago-
cytosis by human blood leucocytes
Nature (London) 199, 1200 (1963)
- Nathenson, S.G.,
N. Ishimoto,
A.R. Sanderson and
J.L. Strominger:
Enzymatic synthesis and immunochemistry
of α - and β -N-acetylglucosaminylribitol
linkages in teichoic acids from several
strains of Staphylococcus aureus
J.Biol.Chem. 241, 651 (1966)
- Nathenson, S.G. and
J.L. Strominger:
Enzymatic synthesis and immunochemistry of
N-acetylglucosaminylribitol linkages in
teichoic acids of Staphylococcus aureus
strains
J.Biol.Chem. 237, 3839 (1962)
- Nathenson, S.G. and
J.L. Strominger:
Enzymatic synthesis of N-acetylglucosa-
minylribitol linkages in teichoic acid
from Staphylococcus aureus, strain Copen-
hagen
J. Biol.Chem. 238, 3161 (1963)
- Naumow, J.B.,
S.A. Shabarova und
A.N. Beloserski:
Zur Struktur der Ribitteichinsäure aus
Aktinomyces streptomycini (in russ.
Sprache)
Ber.Akad.Wiss.UdSSR 152, 1471 (1963)

- Naumow, J.B. und
M.S. Saretzkaja: Einige Eigenschaften der Glycerinteichin-
säuren aus Actinomyces rimosus T-118 und
Actinomyces antibioticus 39 (in russ.
Sprache)
Ber.Akad.Wiss.UdSSR 157, 207 (1964)
- Oeding, P.: Agglutinability of pyogenic staphylo-
cocci at various conditions
Act.path.et microbiol.scand.41, 310
(1957)
- Oeding, P.: Antigenic properties of Staphylococcus
aureus
Bact.Rev.24, 374 (1960)
- Oeding, P. and
G. Haukenes: Identification of Staphylococcus aureus
antigens and antibodies by means of
the gel precipitation technique
Act.path.et microbiol.scand. 57,4, 438
(1963)
- Ouchterlony, Ö.: Antigen-antibody reactions in gels
Act.path.et microbiol.scand. 26, 507
(1949)
- Park, J.T.: Uridine-5-pyrophosphate derivatives.
I. Isolation from Staphylococcus aureus
J.Biol.Chem. 194 (1952)
- Park, J.T. and
J.L. Strominger: Mode of action of penicillin
Science 125, 99 (1957)
- Partridge, S.M.: Application of the paper partition
chromatogram to the qualitative analysis
of reducing sugars
Nature (London) 158, 270 (1946)

- Peter, G.,
T. Wieland und
B. Rajewsky:
Die indirekte Wirkung von Röntgenstrahlen
auf Lysin
Zschr. Naturforschg. 16b, 198 (1961)
- Raj Bhandary, U.L.
and J. Baddiley:
The intracellular teichoic acid from
Staphylococcus aureus H
Biochem.J. 87, 429 (1963)
- Rajka, E.,
S. Korossy and
M. Gozony:
Das mikrobielle Ekzem
Verl.d.Ung.Akad.d.Wiss.Budapest (1962)
- Rauen, H.M.:
Biochemisches Taschenbuch:
Springer (Berlin,Göttingen,Heidelberg)
Bd.I, 732 (1962)
- Rebers, P.A. and
M. Heidelberger:
Specific polysaccharide of type VI
pneumococcus (I) preparation, properties,
and reactions
J.Am.Chem.Soc. 81, 2415 (1959)
- Rebers, P.A. and
M. Heidelberger:
Specific polysaccharide of type VI
pneumococcus (II) repeating unit
J. Am.Chem.Soc.83, 3056 (1961)
- Robert, P.:
Beiträge zur Ekzemfrage.
IV. Untersuchungen über die Wirkung von
Mikroben auf die Haut
Arch.Derm.Syph.(Berlin) 173, 267 (1935)
und V. Untersuchungen über die Wirkung
von Staphylotoxin auf die Haut
Arch.Derm.Syph.(Berlin) 175, 530 (1937)

- Roberts, W.K.,
J.G. Buchanan and
J. Baddiley:
The specific substance from pneumococcus
type 34 (41). The structure of a phos-
phorusfree repeating unit
Biochem.J. 88, 1 (1963)
- Rogers, H.J. and
A.J. Garrett:
The action of bencylpenicillin and
cycloserine upon ribitol teichoic acid
formation by Staphylococcus aureus
Biochem.J. 88, 6P (1963)
- Rogers, H.J. and
A.J. Garrett:
The interrelationship between mucopep-
tide and ribitol teichoic acid forma-
tion as shown by the effect of inhibi-
tors
Biochem.J. 96, 231 (1965)
- Salton, M.R.:
The bacterial cell wall
Elsevier Publishing Company (Amsterdam,
London, N.Y.) 156 (1964)
- Salton, M.R. and
G. Milhaud:
The nature of the material released
from the cell walls of Bacillus megate-
rium on reaction with bacteriophages
Biochim. Biophys.Acta 35, 254 (1959)
- Salton, M.R. and
G. Pavlik:
Studies of the bacterial cell wall.
VI. Wall composition and sensitivity
to lysozyme
Biochim. Biophys. Acta 39, 398 (1960)
- Sanderson, A.R.,
W.G. Juergens and
J.L. Strominger:
Chemical and immunochemical structure of
teichoic acid from Staphylococcus aureus
(Copenhagen)
Biochem.Biophys. Res.Comm. 5, 472 (1961)

- Sanderson, A.R.,
J.L. Strominger and
S.G. Nathenson: Chemical structure of teichoic acid from
Staphylococcus aureus, strain Copenhagen
J. Biol.Chem. 237, 3603 (1962)
- Sargent, L.J.,
J.G. Buchanan and
J. Baddiley: Synthesis of 4-O- α -D-glucopyranosyl-D-
ribitol, a degradation product of the ri-
bitol teichoic acid from the walls of
Lactobacillus arabinosus
J. Chem.Soc. 2184 (1962)
- Scheidegger, J.J.: Une micro-méthode de l'immuno-électro-
phorèse
Int.Arch.Allerg.7, 103 (1955)
- Schröpl, F.: Über die Natur der im Epicutantest wirk-
samen Stoffe von Staphylococcus aureus.
I. Problematik der Epicutantests mit
Staphylococcus aureus und dessen Kultur-
filtrat
Arch.klin.exp.Derm. 226, 383 (1966)
- Schröpl, F.,
E. Müller und
H. Röckl: Experimentelle Untersuchungen zur Patho-
genese des mikrobiellen Ekzems.
I. Tierexperimentelle Untersuchungen
Arch.klin.exp.Derm. 215, 523 (1963) und
IV. Epicutantests mit Cellophankultur-
filtrat von Staphylococcus aureus (haem.)
am Menschen auf normaler Haut
Arch.klin.exp.Derm. 218, 312 (1964)
- Sevag, M.G.: Eine neue physikalische Enteiweißungs-
methode zur Darstellung biologisch wirk-
samer Substanzen. Isolierung von Kohlen-
hydraten aus Hühnereiweiß und Pneumo-
kokken
Biochem.Zeitschrift 273, 419 (1934)

- Shabarova, Z.A.,
J.G. Buchanan and
J. Baddiley: The composition of pneumococcus type-specific substances containing phosphorus
Biochim. Biophys. Acta 57, 146 (1962)
- Shabarova, Z.A.,
N.A. Hughes and
J. Baddiley: The influence of adjacent phosphate and hydroxyl groups on amino acid esters
Biochem. J. 83, 216 (1962)
- Sharpe, M.E.,
A.L. Davison and
J. Baddiley: Teichoic acids and group antigens in lactobacilli
J.Gen.Microbiol. 34, 333 (1964)
- Shaw, N. and
J. Baddiley: The teichoic acid from the walls of Lactobacillus buchneri NCIB
Biochem.J. 93, 317 (1964)
- Singleton, L.,
G.W. Ross and
J. Kohn: Staphylococcal teichoic acid antibody in the sera of patients with burns
Nature (London) 203, 1173 (1964)
- Strange, R.E.: The structure of an amino sugar present in certain spores and bacterial cell walls
Biochem. J. 64, 23P (1956)
- Strange, R.E. and
L.H. Kent: The isolation, characterization and chemical synthesis of muramic acid
Biochem.J. 71, 333 (1959)
- Strominger, J.L.: Biosynthesis of bacterial cell walls
zitiert aus 'The Bacteria',
Eds.I.C. Gunsalus and R.Y. Stanier,
N.Y. Acad.Press, Inc. 413 (1962a)

- Strominger, J.L.: Unveröffentlichte Beobachtungen,
zitiert nach Haukenes, G.
Immunochemical studies of polysaccharide
A of *Staphylococcus aureus*
Act.path.et microbiol.scand. 55, 450
(1962b)
- Strominger, J.L. and J.M. Ghuysen: On the linkage between teichoic acid and
the glycopeptide in the cell wall of
Staphylococcus aureus
Biochem.Biophys.Res.Comm. 12, 418 (1963)
- Strominger, J.L., J.T. Park and R.E. Thompson: Composition of the cell wall of *Staphylo-*
coccus aureus. Its relation to the
mechanism of action of penicillin
J.Biol.Chem. 234, 3263 (1959)
- Tipper, D.J., J.M. Ghuysen and J.L. Strominger: Structure of the cell wall of *Staphylo-*
coccus aureus strain Copenhagen.
3. Further studies of the disaccharides
Biochem.J. (Wash.) 4, 468 (1965)
- Torii, M., E.A. Kabat and A.E. Bezer: Separation of teichoic acid from
Staphylococcus aureus into two immuno-
logically distinct specific poly-
saccharides with α - and β -N-acetyl-
glucosaminyl linkages respectively. An-
tigenicity of teichoic acids in man
J. Exp. Med. 120, 13 (1964)
- Wicken, A.J.: The glycerol teichoic acid from the cell
wall of *Bacillus stearothermophilus* B 65
Biochem.J. 99, 108 (1966)
- Wicken, A.J. and J. Baddiley: Structure of intracellular teichoic
acids from group D streptococci
Biochem.J. 87, 54 (1963)

- Wicken, A.J.,
S.D. Elliott and
J. Baddiley: The identity of streptococcal group D
antigen with teichoic acid
J. Gen. Microbiol. 31, 231 (1963)
- Wieghard, C.W. and
L.A. Julianelle: The immunological specificity of staphylo-
cocci. II. The chemical nature of the
soluble specific substances
J. Exp.Med. 62, 23 (1935)
- Wieland, Th. und
G. Pfeleiderer: Analytische und mikropräparative Träger-
elektrophorese mit höheren Spannungen
Angew.Chem. 67, 257 (1955).
- Work, E.: Biochemistry of the bacterial cell wall
Nature (London) 179, 841 (1957)
- Wright, A.E.: Methode zitiert nach Hallmann, L.
"Bakteriologie und Serologie", 3.Auflage
G. Thieme, Stuttgart, 762 (1961)
- Young, R.J. and
G.R. Barker: The ribosomes of staphylococcus aureus
(strain Duncan)
Biochem. J. 91, 22c (1964)
- Young, F.E.,
D.J. Tipper and
J.L. Strominger: Autolysis of cell wall of Bacillus
subtilis. Mechanism and possible re-
lationship to competence
J. Biol. Chem. 239, 3600 (1964)

LEBENS LAUF

Als fünftes Kind des Kaufmannes Karl Camphausen und seiner Ehefrau Marianne, geborene Schneider, wurde ich am 6.9.1937 in Mülheim an der Ruhr geboren. Nach Besuch der Volksschulen in Schruns in Vorarlberg, Mülheim/Ruhr und Wollershausen am Harz war ich Schüler des staatlichen Gymnasiums in Duderstadt am Harz und legte 1957 am städtischen Gymnasium in Bad Salzungen die Reifeprüfung ab. In der Folgezeit diente ich in der Deutschen Bundeswehr und begann im Sommersemester 1960 mit dem Medizinstudium an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg, wo ich 1963 die ärztliche Vorprüfung ablegte.

Nach klinischen Semestern in Wien und Würzburg beendete ich das Medizinstudium mit der ärztlichen Prüfung im Juli 1966 in Würzburg. Anschließend arbeitete ich als Medizinalassistent in der Universitätshautklinik und chirurgischen Universitätsklinik in Würzburg.

Ich versichere ehrenwörtlich, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig verfaßt habe und außer der angegebenen Literatur keine weiteren Hilfsquellen benutzt habe.

Ich versichere ehrenwörtlich, daß ich bisher von keiner anderen Seite eine Dissertationsarbeit zur endgültigen Bearbeitung erhalten habe.

Günter Camphausen

BÖHLER-DRUCK

87 WÜRZBURG, Wirsbergstr. 10

Tel. 54143